

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Agronomická fakulta**  
**Ústav molekulární biologie a radiobiologie**



**Proteom rostlin v reakci na abiotický stres**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

Mgr. Martin Černý, PhD.

Vypracovala:

Bc. Veronika Čotková

Brno 2015



# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Veronika Čotková**

Studijní program: Fytotechnika

Obor: Biotechnologie rostlin

Konzultant: Mgr. Jan Skalák

Název tématu: **Proteom rostlin v reakci na abiotický stres**

Zásady pro vypracování:

1. Základem teoretické části práce bude literární přehled o vnímání stresu v rostlinách a možnostech využití metod moderní proteomiky při odhalování molekulárních mechanismů tohoto děje.
2. Hlavním cílem diplomové práce bude studium změn proteomu modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*, které jsou vyvolány teplotním stresem.
3. Dále bude sledována interakce signalizace teplotního stresu a signalizace rostlinných hormonů cytokininů současně s vlivem intenzity světla.
4. Hlavním nástrojem pro proteomickou analýzu bude 2D elektroforéza a hmotnostní spektrometrie.
5. Pro zpracování dat bude využit software Decodon Delta 2D, MASCOT a internetové databáze (UniProt, TAIR, Kegg, atd.)
6. Na základě získaných výsledků studentka ve spolupráci se svým školitelem připraví návrh dalších experimentů, které povedou k hlubšímu porozumění sledované tematiky.
7. Studentka vypracuje detailní literární rešerši, která bude sloužit jako základ diplomové práce, a odevzdá ji nejpozději do 1.9.2013.
8. Výsledky své práce bude průběžně konzultovat se školitelem a pravidelně prezentovat na skupinovém i ústavním semináři.



Rozsah práce: 50-60

Seznam odborné literatury:

1. TAIZ, L. – ZEIGER, E. *Plant physiology*. 5. vyd. Sunderland, Mass.: Sinauer Assoc., 2010. 782 s. ISBN 978-0-87893-565-9.
2. BUCHANAN, B. B. – JONES, R. L. – GRUISSEM, W. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA : American Society of Plant Biologists , 2000.
3. Ahmed, H. (2005) Principles and reactions of protein extraction and purification, and characterization. CRC Press LLC, New York, USA.
4. Ha et al., Trends in Plant Science. 2012. 17(3):172-179; Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses
5. Westermeier, R., Naven, T. (2002) Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis. Wiley-VCH Verlag

Datum zadání diplomové práce: říjen 2012

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2014

  
**Bc. Veronika Čotková**  
Autorka práce



  
**Mgr. Martin Černý, Ph.D.**  
Vedoucí práce

  
**prof. RNDr. Břetislav Brzobohatý, CSc.**  
Vedoucí ústavu

  
**prof. Ing. Ladislav Zeman, CSc.**  
Děkan AF MENDELU

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **Proteom rostlin v reakci na abiotický stres** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....  
podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce Mgr. Martinovi Černému, PhD. za velkou trpělivost a cennou pomoc při konzultacích a zpracování této práce. Dále svým nejbližším za neutuchající psychickou podporu při studiu.

## **ABSTRAKT**

Rostliny si se svým přisedlým způsobem života vyvinuly komplexní mechanismy jak se vyrovnat s nepříznivými podmínkami prostředí. Tato diplomová práce shrnuje současné znalosti na toto téma a zaměřuje se na světlo, teplotu a fytohormony v odpovědích rostlin na abiotický stres. Praktická část se věnuje proteomice a dokončuje a navazuje na projekt zahájený během mé bakalářské práce. Transgenní klíčící rostliny *Arabidopsis* nesoucí inducibilní cytokinin oxidázu/dehydrogenázu z ječmene (CaMV35S>GR>HvCKX2) byly profilovány pro objasnění odpovědí na úrovni proteomu na snížené hladiny cytokininů pod teplotním stresem za standardní ( $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) a nízké intenzity světla ( $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Pomocí 2-DE analýzy a analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie se podařilo celkem objevit 63 rozdílně abundantních proteinů zahrnutých v různých metabolických procesech. Tato data poskytují důkaz o spojení mezi teplotní, světelnou a cytokininovou signalizací v *Arabidopsis* a budou použita při modelování interakcí cytokininu – světlo – teplota.

Klíčová slova: teplota, intenzita světla, cytokininy, protein, proteomika

## **ABSTRACT**

Plants as a sessile organisms have evolved complex mechanisms to cope with unfavorable environmental conditions. This diploma thesis summarizes current state of knowledge and focuses on light, temperature and phytohormones in plant abiotic stress responses. The practical part is devoted to proteomics and completes and extends the project started during my Bachelor program. Transgenic *Arabidopsis* seedlings carrying inducible barley cytokinin oxidase/dehydrogenase (CaMV35S> GR> HvCKX2) were profiled to elucidate proteome-wide responses to down-regulation of cytokinin levels under heat stress at standard ( $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) and low light intensity ( $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). In total, 2-DE analysis and mass spectrometry analysis revealed 63 differentially abundant proteins involved in diverse metabolic processes. These data provide evidence of a link between temperature, light and cytokinin signaling in *Arabidopsis* and will be used in the modeling of cytokinin-light-temperature interactions.

Key words: temperature, light, cytokinins, protein, proteomics

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	8
2.1	Proteomika .....	8
2.1.1	Metody separace a frakcionace v proteomice .....	9
2.1.2	Hmotnostní spektrometrie .....	11
2.2	Cytokininy .....	14
2.2.1	Struktura .....	14
2.2.2	Biosyntéza .....	15
2.2.3	Metabolismus .....	16
2.2.4	Signální dráha cytokininů .....	17
2.3	Rostliny a abiotický stres .....	20
2.3.1	Fyziologické odpovědi rostlin na stres .....	21
2.3.2	Signalizace v reakci na abiotický stres .....	21
2.4	Vnímání teploty v rostlinách .....	28
2.4.1	Role membrány ve vnímání teploty .....	29
2.4.2	Signální lipidy a teplotní stres .....	31
2.4.3	Specifický tok vápníku .....	31
2.4.4	Proteiny teplotního šoku .....	33
2.4.5	Další mechanismy .....	35
2.5	Interakce mezi signální dráhou světla a teploty .....	37
3	MATERIÁL A METODIKA .....	39
3.1	Rostlinný materiál a jeho kultivace .....	39
3.2	Indukce teplotního stresu .....	39
3.3	Izolace celkového proteomu s odstraněním Rubisco .....	39
3.4	Izoelektrická fokusace, SDS-PAGE a digitalizace obrazu .....	40
3.5	Analýza obrazu gelů .....	41
3.6	Digestce proteinů v gelech .....	41
3.7	Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie .....	41
3.8	Vyhodnocení dat .....	42
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	43
4.1	Proteomická analýza .....	44

4.2	Shluková analýza proteinů se signifikantně změněnou abundancí.....	47
4.3	Identifikace signifikantně regulovaných proteinů pomocí MS.....	51
4.4	Lokalizace regulovaných proteinů.....	55
4.5	Funkce lokalizovaných proteinů.....	55
4.6	Vybrané regulované proteiny primárního metabolismu.....	58
4.7	Vybrané regulované proteiny zapojeny do jiných pochodů.....	59
5	ZÁVĚR.....	61
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	62
7	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	68
8	SEZNAM TABULEK.....	69
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	69
10	SEZNAM PŘÍLOH.....	71
11	PŘÍLOHY.....	72



# 1 ÚVOD

Rostliny jsou svým přisedlým způsobem života často vystaveny stresujícím podmínkám prostředí a to v přírodních i zemědělských podmínkách. Díky rostoucímu zájmu společnosti o ekologii a snaze agronomů šlechtit rostliny odolnější vůči nepříznivým podmínkám prostředí je studium environmentálních vlivů v současnosti velmi aktuálním tématem. Poznání signálních drah na molekulární úrovni a pochopení fyziologických procesů během působení stresu má nesmírný význam jak pro zemědělství, tak pro životní prostředí.

Jedním z nejvýznamnějších abiotických faktorů, které mohou stresově působit na rostlinu, je teplota. Předěšlé studie ÚMBR MENDELU odhalily možné propojení signalizace teploty a signální dráhou fytohormonů cytokininů (Černý et al., 2011). Na tyto výsledky navazoval experiment započatý během má bakalářská práce, na nějž v práci diplomové navazují a vyhodnocují jeho závěr. Cílem experimentu bylo zjistit míru odpovědi proteomu modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* na tepelný stres, porovnat tuto odpověď s reakcí transgenních rostlin s modulovanou hladinou endogenních cytokininů a sledovat účinek teploty a hladiny endogenních cytokininů při různých intenzitách světla a identifikaci jednotlivých proteinů vykazujících odlišné chování pak přispět k pochopení vlivu teploty, intenzity světla a cytokininů na metabolismus rostliny.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Proteomika

Proteomika jako postgenomická disciplína si dává za úkol identifikovat a kvantifikovat všechny proteiny v proteomu, včetně jejich exprese, lokalizace v buňce, interakcí, posttranslačních modifikací a metabolické přeměny jako funkci času a prostoru. Celkové mapování proteomu je tedy velkou výzvou oproti sekvenování genomu či profilování transkriptomu.

Pokrok v proteomice byl řízen hlavně vývojem nových technologií pro separaci peptidů a proteinů, analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie a analýzou bioinformatických dat. Hmotnostní spektrometrie se ukázala být klíčovým nástrojem pro velkorozměrové proteinové analýzy. V posledním desetiletí bylo dosaženo velkých pokroků v rozlišení, přesnosti v stanovení hmotnosti, citlivosti a rychlosti snímání hmotnostních spektrometů vhodných pro analýzu proteinů. (Zhang et al., 2013)

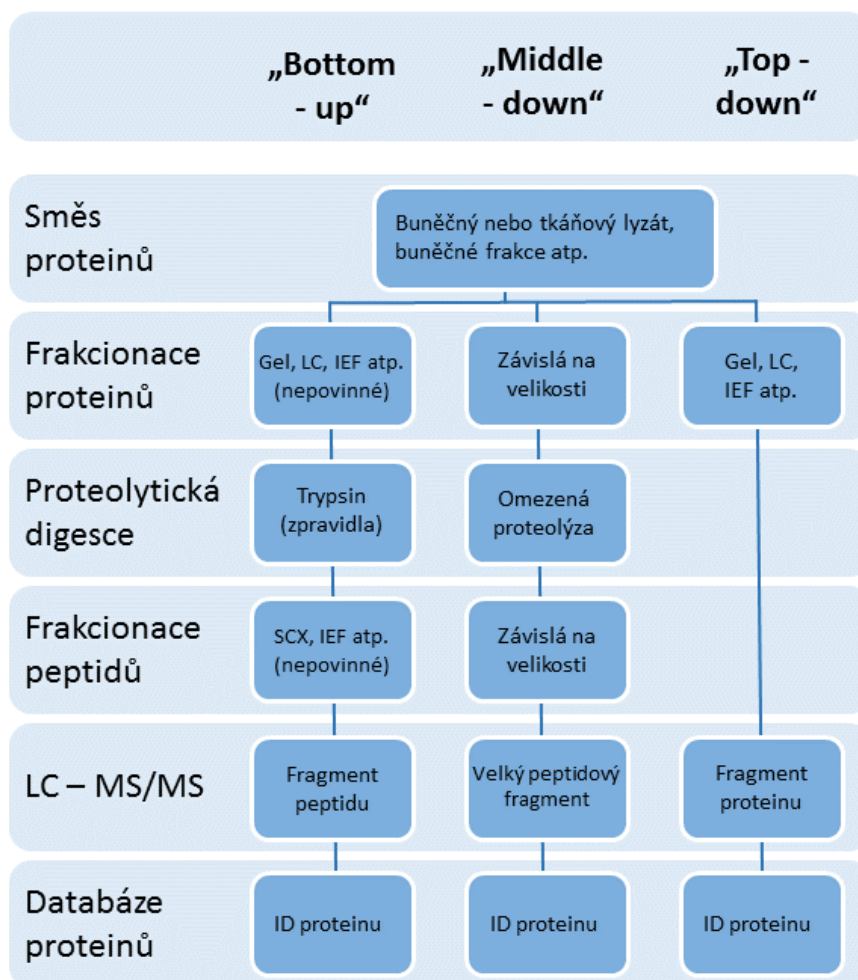
Studium proteinů může být obecně rozděleno do několika různých skupin podle strategie: tzv. „top-down“, „bottom-up“, případně „middle-up“ proteomika. (Obr.1)

„Bottom-up“ proteomika se zabývá charakterizací proteinů na základě analýzy komplexní směsi peptidů uvolněných z proteinů proteolýzou. Tento přístup je také často nazývá „shotgun“ proteomikou (analogie k „shotgun“ genomickému sekvenování). Během analýzy je komplexní směs peptidů frakcionována a podrobena analýze pomocí kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS) a proteiny jsou poté identifikovány porovnáváním hmotnostních spekter se spektry teoretickými generovanými z proteinové databáze *in silico*. (Wright et al., 2012; Zhang et al., 2013)

Oproti tomu „top-down“ proteomika je využívána k charakterizaci intaktních proteinů. Tento přístup je významný, protože při analýze intaktních proteinů jsou lépe zachovány biochemické charakteristiky, posttranslační modifikace (PTM) a umožňují tak větší specifickou selektivitu a identifikaci proteoforem. Oproti „bottom-up“ přístupu však s sebou nese úskalí v podobě problémů s frakcionací proteinů, ionizací proteinů a fragmentací v plynné fázi a také identifikací. (Wright et al., 2012; Zhang et al., 2013)

Určitým hybridem mezi „bottom-up“ a „top-down“ metodikou a instrumentací je tzv. „middle-down“ proteomika. Ta analyzuje větší proteinové fragmenty než „bottom-up“ proteomika, což minimalizuje redundanci mezi proteiny. Navíc velké peptidy

přináší výhody „top-down“ přístupu v možnosti nahlédnout do PTM bez analytických obtížností analýz intaktních proteinů. (Wright et al., 2012; Zhang et al., 2013)



Obr. 1: **Proteomické strategie**, LC (kapalinová chromatografie), IEF (isoelektrická fokusace), SCX (Strong Cation eXchange – kationtová výměnná chromatografie) (převzato z Zhang et al., 2013)

## 2.1.1 Metody separace a frakcionace v proteomice

### 2.1.1.1 Dvou-dimenzionální elektroforéza (2D-PAGE)

Ačkoliv bylo vyvinuto množství proteomických metod, často jsou používány tradiční techniky jakou je právě dvojdimenzionální SDS (sodium-dodecyl sulfát) polyakrylamidová elektroforéza (PAGE). Pro rozdělení v prvním rozměru využívá amfoterní povahy proteinů, kdy se proteiny pohybují pH gradientem amfolytů podle náboje ke katodě nebo anodě, dokud nedosáhnou svého isoelektrického bodu, tedy pH, při kterém je jejich náboj nulový. V tomto bodě tedy na ně nemá působení elektrického pole žádný vliv. K rozdělení proteinů v druhé dimenzi se využívá polyakrylamidové

elektroforézy za použití SDS (sodium dodecyl sulfát) jako detergentu a chaotropů pro solubilizaci a denaturaci proteinů. SDS vytváří s proteiny komplexní struktury, které maskují přirozený náboj proteinů. Ty se poté v gelové matici pohybují převážně jen na základě své molekulární hmotnosti směrem k anodě (díky negativnímu náboji udělenému pomocí SDS), přičemž měnící se velikost pórů gelu slouží jako molekulární síto. Menší proteiny proto putují rychleji, kdežto větší pomaleji (Ahmed, 2005).

Pro vizualizaci rozdělených proteinů na gelu se poté využívá množství technik jako: a) barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue (detekční limit 100ng), koloidní Coomassie Brilliant Blue (10 ng) či stříbrem (až 1 ng) pro viditelnou oblast spektra či b) fluorescenčního barvení (př. Sypro ruby, 0,25ng). Ačkoliv je barvení stříbrem citlivější, nevykazuje takovou linearitu signálu a je méně kompatibilní s hmotnostní spektrometrií než Coomassie, které je tedy běžněji používáno (Kavoosi a Ardestani, 2012; Wright et al., 2012; Zhang et al., 2013).

#### ***2.1.1.2 Ostatní metody a přístupy***

Od svých počátků v 70. letech 20. století neprodělala tradiční proteomika využívající gelovou elektroforézu žádné velké změny mimo optimalizací a některých variací postupu (př. reverzní 2D GE, kde byly výše popsané kroky prohozeny v pořadí) (Wright et al., 2012). Některé z nedostatků klasické 2D-PAGE (jako je pracnost, časová náročnost a variace mezi gely) se podařilo překonat představením diferenciální gelové elektroforézy (DIGE), která analyzuje více vzorků souběžně a dochází tak k větší reprodukovatelnosti experimentů. Využívá se fluorescenčního značení Cy3 a Cy5 N-hydroxysukcinimidyl ester cyaniny, které vykazují odlišná excitační fluorescenční spektra při různých vlnových délkách (Zhang et al., 2013).

Jednou z dalších jednoduchých technik separace proteinů je vysolování. Rozpustnost proteinu je ovlivňována ionty a použitím solí, jako např. síran amonný, se zvětší hydrofobita povrchu proteinu, což vede k jeho vysrážení. Rozdílné proteiny, odlišující se složením aminokyselin a tedy hydrofobními a hydrofilními vlastnostmi, precipitují při různých koncentracích solí a použitím různé koncentrace solí tedy můžeme docílit jisté frakcionace proteomu. Před další analýzou je však nutné odsolení např. pomocí dialýzy, proto se v současnosti přistupuje spíše k elektromigračním či chromatografickým metodám (Duong-Ly a Gabelli, 2014).

K izolaci cílových proteinů se může využít imunoprecipitace. Tato imunochemická metoda využívá specifitu protilátek k proteinům (antigenům) k jejich oddělení z komplexních směsí. Je známo několik metod, z nichž každá má svoje unikátní výhody a metody spolu mohou být kombinovány v ko-immunoprecipitaci ke studiu protein-proteinových interakcí a zkoumání funkčního genomu (Kaboord a Perr, 2008).

Protože separace pomocí gelových technik může být časově náročná, využívá se ve spojení s hmotnostní spektrometrií separace pomocí kapalinové chromatografie s využitím tzv. MudPIT technologie (Multidimensional Protein Identification Technology). Uspořádání je obdobné jako u 2D elektroforézy, v první dimenzi jsou proteiny separovány zpravidla pomocí SCX (Strong Cation Exchange) chromatografie, kdy jsou fragmentované proteiny rozděleny na základě jejich náboje. Během separace v druhé dimenzi je pak využívána zpravidla chromatografie na reverzní fázi, kde jsou poté peptidy rozděleny na základě své hydrofobicity (Wright et al., 2012).

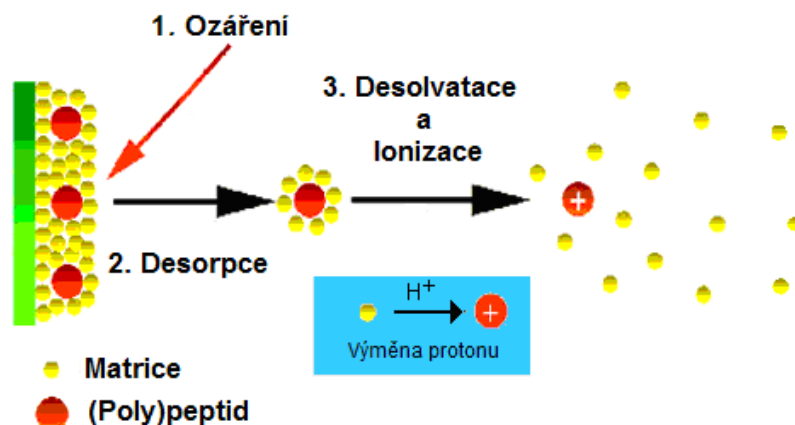
### **2.1.2 Hmotnostní spektrometrie**

K identifikaci proteinů se v proteomice nejběžněji využívá hmotnostní spektrometrie (MS). Identifikaci biomolekul pomocí MS umožnil v 80. letech 20. století vývin dvou metod pro měkkou ionizaci vzorku. Jednalo se o MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization; Karas et al., 1987) ESI (Electrospray Ionization; Yamashita a Fenn, 1984). Za obě metody byla udělena Nobelova cena.

#### **2.1.2.1 Metody ionizace**

##### **2.1.2.1.1 MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*)**

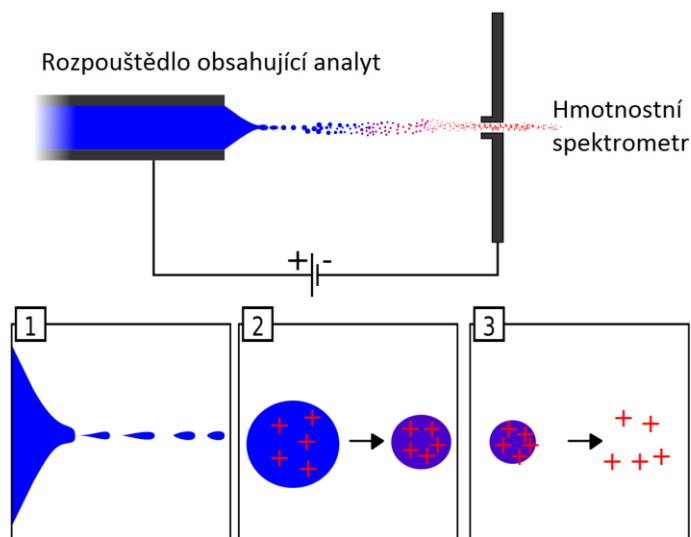
Již z názvu této metody vyplývá, že jde o způsob ionizace vzorku za přítomnosti matrice. Princip metody spočívá v tom, že proteiny jsou krystalizovány společně s médiem matrice, kterou ve většině případů tvoří organická kyselina, např. CHCA (kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová) či DHB (kyselina 2,5-dihydroxybenzoová). Pomocí laseru určité vlnové délky dojde k iniciaci desorpce a matrice absorbuje většinu energie laseru. Exponenciální nárůst tepla způsobí sublimaci krystalů matrice a přechod molekul do plynného stavu. Dojde k předání protonu z matrice na proteiny a ty poté mohou být analyzovány na základě poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). (Obr. 2) Jde o jemnou ionizační techniku, která je ve většině případů napojena na analyzátor TOF (*Time of Flight*). (Wright et al., 2012)



Obr. 2: Schéma MALDI (Radboud University Nijmegen, Faculty of Science, dostupné na: <http://www.ru.nl/science/gi/facilities/other-devices/maldi-tof/>)

### 2.1.2.1.2 ESI

Ionizace za pomoci elektrospreje je druhou metodou měkké ionizace proteinových molekul a je nejběžnější volbu ionizace pro LC/MS. Vzorek při ní prochází kapilárou, na níž je vloženo vysoké napětí. Intenzivní pole na konci kapiláry tvoří kónický meniskus (Taylorův kužel), ze kterého se uvolňuje sprej vysoce nabitých kapiček. Z vytvořených kapiček se odpařuje rozpouštědlo, kapičky se smršťují a koncentruje se jejich náboj. Odpařování probíhá do chvíle, než se dosáhne Raylightova limitu a kapičky se rozpadnou Coulombickou explozí a vznikají ionty. Pokud je v molekule více ionizačních míst mohou vznikat vícenásobně nabité ionty.



Obr. 3: Schéma ESI (převzato z en.wikipedia.org; autor Evan Mason)

(1) Taylorův kužel emituje proud kapek kapaliny, (2) odpařování rozpouštědla a koncentrace náboje v kapičkách, (3) dosáhnutí Raylightova limitu a následná explozivní disociace kapky.

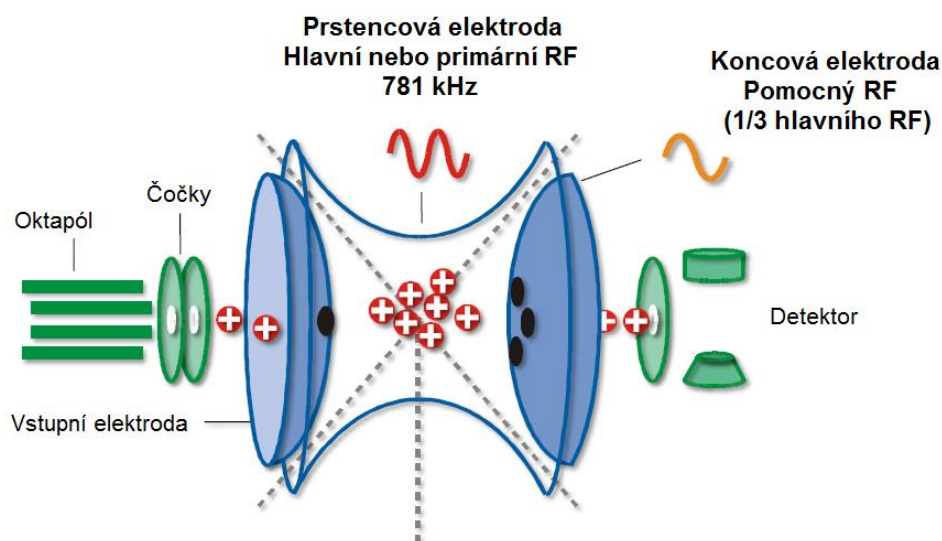
## 2.1.2.2 Hmotnostní analyzátory

### 2.1.2.2.1 Time of Flight (TOF)

Tento typ analyzátoru je nejběžnější v použití s MALDI a v ESI pro kombinaci s analyzátory kvadrupólového typu. Ionům je v analyzátoru udělena počáteční kinetické energie a fragmenty proteinů poté putují vakuem v trubici analyzátoru. K rozdělení dojde na základě rozdílných rychlostí nepřímo úměrných velikosti fragmentu, kdy menší fragmenty doletí k detektoru na konci trubice dříve. (Aebersold a Mann, 2003)

### 2.1.2.2.2 Iontová past

Nejčastějším analyzátozem používaným společně s ESI je typu iontové pasti (IT) a kvadrupólu. Je několik typů iontových pastí: 3D iontová past, lineární kvadrupólová past či tzv. Orbitrap, který využívá Fourierovu transformaci. Pro identifikaci v této diplomové práci byla využita 3D iontová past, proto dále uvedu její základní princip. Ionty peptidů jsou vstříknuty pomocí ESI přímo z kapalinové chromatografie a jsou koncentrovány ve specifické „záchytné“ oblasti analyzátoru. Ta je vytvořena působením napětí mezi 2 čočkovitými elektrodami a jednou prstencovou elektrodou. Ionty jsou po vstupu do pasti zachyceny pomocí inertního plynu (většinou helium) v jejím středu a jsou tak stabilizovány v elektrickém poli. Postupnou změnou napětí jsou ionty podle jejich  $m/z$  vypuzovány na detektor výstupním otvorem. (Obr.: 4)(Wright et al., 2012; Aebersold a Mann, 2003)



Obr. 4 Schéma principu fungování iontové pasti (převzato z Bruker Daltonics Training Documents)

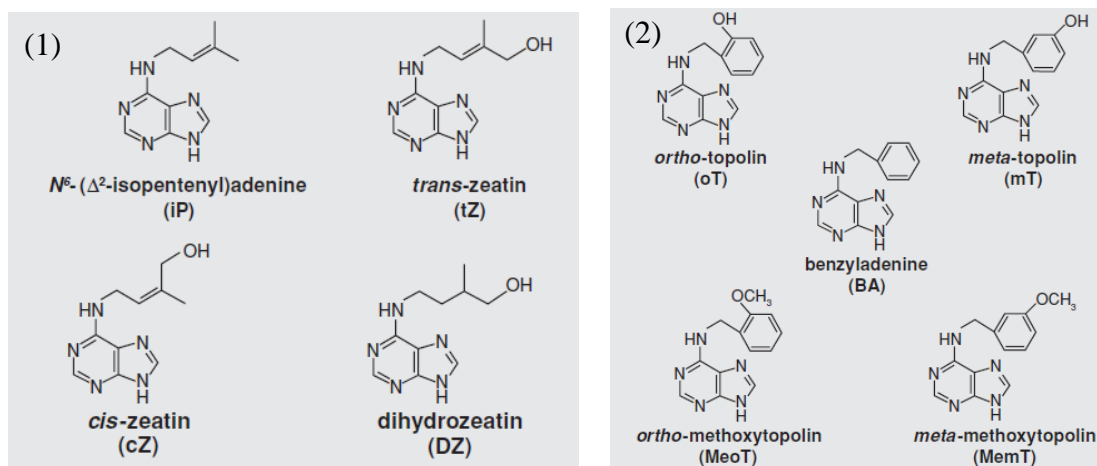
## 2.2 Cytokininy

Cytokininy jsou třídou rostlinných hormonů (fytohormonů), které byly charakterizovány jako N<sup>6</sup> substituční deriváty adeninu. Prvním definovaným, izolovaným a syntetizovaným zástupcem této skupiny byl kinetin, který získal svůj triviální název od své schopnosti iniciovat buněčné dělení (cytokinezi) v buněčných kulturách tabáku (Miller, 1955).

Cytokininy se podílí na regulaci množství rozdílných aspektů rostlinného růstu a vývoje, jako je funkce meristémů, vývoj chloroplastů, modulace vztahu „zdroj-sink“, příjem živin či reakce na biotický i abiotický stres (Argueso et al., 2009).

### 2.2.1 Struktura

V přírodě můžeme najít cytokininy běžně ve dvou formách: isoprenoidní a aromatické cytokininy. Prvně zmíněné, mezi něž řadíme například N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin a *trans*-zeatin, jsou běžně zastoupeny ve většině rostlinných druhů, i když jejich složení se může měnit v závislosti na druhu, pletivu a vývojové fázi. Oproti tomu aromatické cytokininy jako například benzyladenin byly nalezeny pouze v některých rostlinných druzích (Sakakibara, 2006) (Obr. 5).



Obr. 5: Zástupci isoprenoidních (1) a aromatických (2) cytokininů (Sakakibara, 2006)



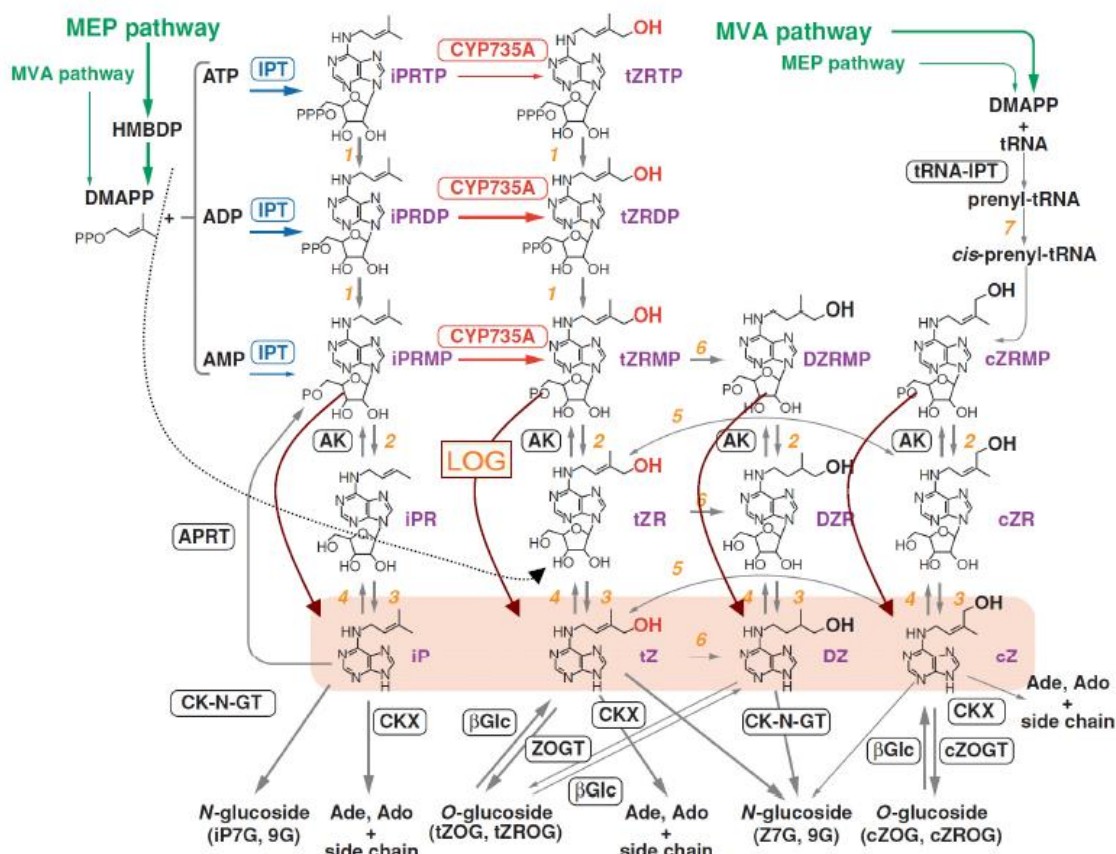
### 2.2.2 Biosyntéza

Novými studii bylo potvrzeno, že mimo biosyntézy cytokininů v kořeni a jejich následném transportu xylémem do stonku, probíhá biosyntéza také v mladých listech, stoncích, květech, embryích a pravděpodobně dalších pletivech (Kudo et al, 2010).

Prvním krokem biosyntézy cytokininů je přenos isopentenylového zbytku z dimethylallyl difosfátu (DMAPP) na  $N^6$  pozici ATP/ADP, který je katalyzován enzymem isopentenyltransferázou (IPT). Bezprostředním produktem reakce jsou isopentenyladenin (iP) ribotidy, jejichž izoprenový postranní řetězec je následně *trans*-hydroxylován pomocí P450 monooxygenáz CYP735A1 a CYP735A2 na zeatin ribotidy (Argueso et al., 2009).

Jsou dva typy IPT, adenylátová IPT (EC. 2.5.1.27), která připojuje isopentenylovou skupinu k  $N^6$  atomu AMP/ADP/ATP, a tRNA IPT (EC 2.5.1.8), která připojuje totéž, ale k adeninu na tRNA (Frébort et al., 2011).

Aby se staly vzniklé iP a tZ nukleotidy biologicky aktivními, musí být konvertovány do formy nukleobazí pomocí katalýzy enzymem cytokinin ribosid 5'-monofosfát-fosforibohydrolázou (LOG, EC 3.2.2.n). Exprese LOG je lokalizována ve špičce stonkového meristému a pravděpodobně doladuje prostorovou distribuci bioaktivních cytokininů k regulaci aktivity meristému (Hirose et al, 2008; Argueso et al., 2009). (Obr. 6)



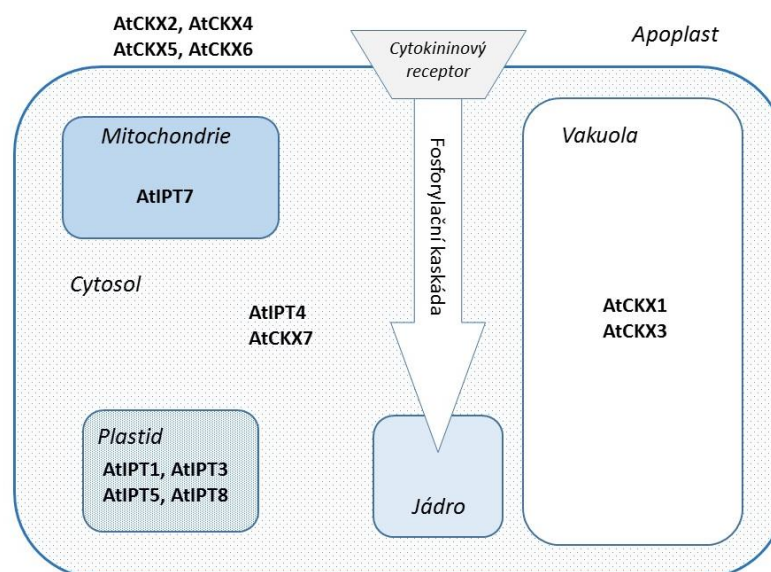
Obr. 6: **Současný model biosyntetické dráhy isoprenoidních cytokininů v *Arabidopsis*** Isoprenoidní postranní řetězce  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adeninu (iP) a trans-zeatinu (tZ) převážně pochází z methylerythritol (MEP) fosfátové dráhy, kdežto velká část postranních řetězců cis-zeatinu (cZ) je odvozena z mevalonátové (MEV) dráhy. (upraveno z Sakakibara, 2006)

### 2.2.3 Metabolismus

Ustálená hladina cytokininů v rostlině je dána relativním poměrem regulace biosyntézy, mírou degradace cytokininů, jejich konjugace a uvolňováním z konjugovaných forem (Argueso et al., 2009).

Nevratná degradace probíhá u cytokininů s nenasyceným postranním řetězcem oxidativním štěpením na  $N^6$  konci řetězce, čímž se vytvoří adenin či jeho korespondující derivát (u substituovaných cytokininů) a aldehyd derivovaný z postranního řetězce. Reakce probíhá dehydrogenací cytokininů na iminový meziprodukt, kde akceptor elektronů odčerpá dva elektrony z flavinového kofaktoru enzymu označovaném jako cytokinin oxidáza/dehydrogenáza (CKX, EC 1.5.99.12) (Frébort et al., 2011). CKX jsou ve vyšších rostlinách kódovány malými genovými rodinami s proměnlivým počtem členů. V *Arabidopsis* bylo identifikováno 7 různých CKX-kódujících genů (*AtCKX1-7*), přičemž nejvyšší enzymatickou aktivitu mají

paralogy CKX2 a CKX4. Tyto dva enzymy preferují jako substráty volné cytokininové báze za neutrálního a slabě kyselého pH a spolu s CKX5 a CKX6 pravděpodobně regulují úroveň cytokininů v apoplastu (Obr. 7) (Galuszka et al., 2007).



Obr. 7: **Buněčné rozmístění biosyntetických a degradačních enzymů cytokininů v *Arabidopsis thaliana*** (převzato z Frébort et al., 2011)

Dalším pochodem regulujícím hladinu cytokininů je jejich glykosylace, která může probíhat na N7 a N9 pozici purinového řetězce nebo na hydroxylové skupině postranního řetězce tZ, cZ a DZ. Zatímco N-glukosylace je prakticky nevratná, z O-glukosidů mohou být aktivní cytokininy uvolněny  $\beta$ -glukosidázou (EC 3.2.1.21), proto jsou považovány za zásobní formy cytokininů (Sakakibara, 2006).

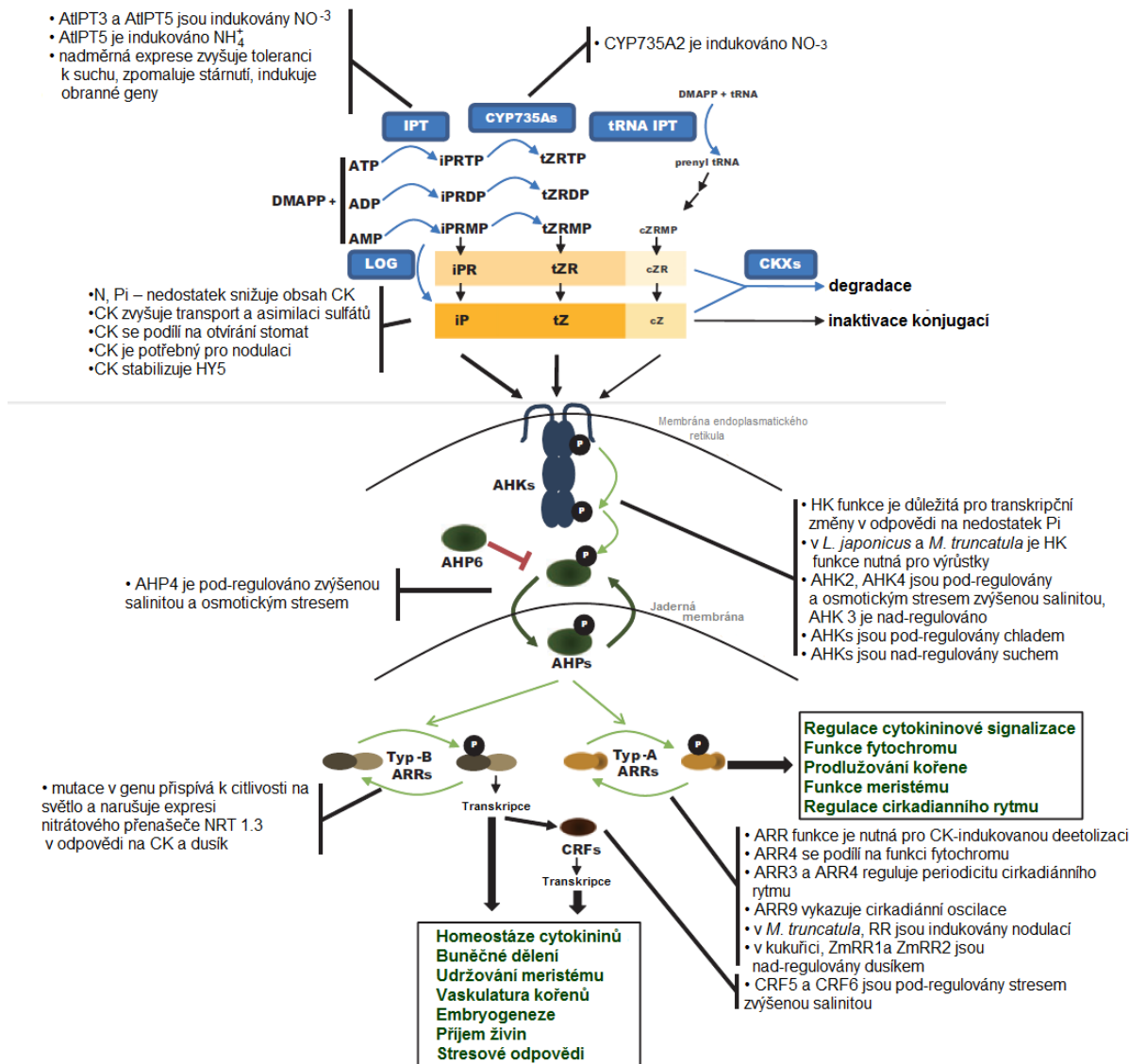
#### 2.2.4 Signální dráha cytokininů

Signální dráha cytokininů je tvořena několikrakovou kaskádou His-Asp fosforylací, která je podobná dvoukomponentní signální dráze bakterií či kvasinek. Skládá se ze senzorové kinázy, histidinových fosfotransferových proteinů a regulátorů odpovědi. (Obr. 8) (Ferreira a Kieber, 2005).

Současný model ukazuje, že signál je vnímán receptory typu histidinových kináz (AHK), které jsou vázány převážně na membrány endoplasmatického retikula (Wulfetange et al., 2011). Po navázání cytokininu a autofosforylaci receptoru je signál přenášen fosforylační kaskádou ke členům rodiny Arabidopsis His fosfotransferových proteinů (AHP), které se translokují do jádra, kde fosforylují regulátory odpovědi (ARR) typu B. Ve stejný okamžik také řídí akumulaci transkripčních faktorů odpovědi

na cytokininy (CRF). Aktivované ARR typu B jako transkripční faktory indukují transkripci genů odpovědi na cytokininy, včetně ARR typu A a CRF (Perilli et al., 2010). Regulátory typu B jsou odpovědné za transkripci téměř veškerých procesů závislých na cytokininech v *Arabidopsis*. Trojitý mutant ARR genů ARR1, ARR10 a ARR12 vykazoval většinu znaků syndromu deficiencie cytokininů, což ukazuje, že jsou tyto geny centrálními regulátory aktivity cytokininů během vegetativního vývoje. Fosforylace ARR typu A je pak potřebná pro jejich negativní zpětně vazebnou regulaci cytokininové signální dráhy. Jejich interakce s AHP (ale ne ARR typu B) pak napovídá, že jejich činnost při zpětné vazbě probíhá na úrovni signalizace zprostředkované AHP (Werner a Schmölling., 2009).

Prvky cytokininové signální dráhy sdílí společné prvky s bakteriální dvou-komponentní signální kaskádou, která je využívána k vnímání a odpovědi na množství environmentálních faktorů. Cytokininy a jejich signální dráhy jsou také propojeny s vnímáním prostředí. Hrají roli v asimilaci živin, včetně dusíku, fosforu, síry a železa. Prvky dvoukomponentální dráhy se také podílí na cirkadiálních rytmech, vnímání světla, odpovědích na biotické a abiotické stresy, včetně stresu teplotního, stresu zasolením, suchem a interakcemi s patogeny (Obr.8) (Argueso et al., 2009).

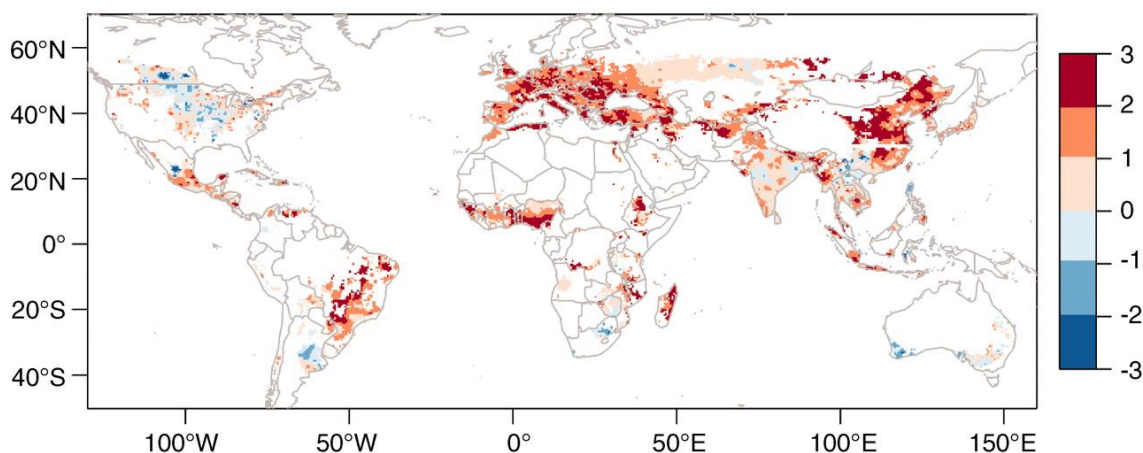


Obr. 8: Biosyntéza a signalizace cytokininů je úzce propojena s environmentálními vstupy (Argueso et al., 2009)

## 2.3 Rostliny a abiotický stres

Dle studie Organizace pro výživu a zemědělství FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations) z roku 2007 jsou pouhá 3,5% zemského povrchu neovlivněna nějak omezenými podmínkami prostředí a přestože většinu těchto podmínek lze odstranit vhodnými agrotechnickými technologiemi, některé environmentální faktory stále mohou limitovat produkci plodin v zemědělských oblastech (Velthuizen, Harrij van, 2007). Přestože je obtížné získat přesné odhady působení abiotického stresu na produkci plodin, je zřejmé, že abiotický stres bude mít i nadále významný dopad na rostlinou produkci. Trendy jako pokles ploch orné půdy, snižování dostupnosti vodních zdrojů a zvyšující se trend globálního oteplování a změny klimatu mají vliv na snižování produkce základních plodin.

Od roku 1980 jsou pozorovány významné pozitivní trendy v teplotě během vegetačního období ve všech hlavních pěstitelských regionech hlavních plodin, tedy kukuřice, pšenice, rýže a sóji (ty tvoří až 75% kalorií přímo či nepřímo spotřebovaných člověkem). Více jak 65% zemí pozorovalo nárůst průměrné teploty za vegetační období o jedno-násobek historické směrodatné odchylky pro kukuřici a rýži, s číslem mírně vyššími pro pšenici a nižšími pro sóju. Více jak čtvrtina zemí pak pozorovala dokonce dvojnásobek této odchylky (Lobell et al., 2011) (Obr. 9).



Obr. 9: Mapa teplotních trendů v letech 1980-2008 pro vegetační období hlavních plodin; Trend je vyjádřen jako poměr celkového trendu v období 29 let a historické směrodatné odchylky ( $\sigma$ ) meziroční fluktuace teplot v letech 1960-2000 (př. trend  $T=1$  znamená, že na konci periody byly teploty vyšší o  $1 \sigma$  než na začátku periody). Pro přehlednost jsou uvedeny pouze oblasti, kde je alespoň 1% plochy pokryté pšenicí, kukuřicí, sójou nebo rýží. Teploty v mnoha lokalitách přesáhly více jak dvojnásobek historické směrodatné odchylky. (Lobell et al., 2011)

Od roku 1950 došlo ke zvýšení průměrné zemské teploty o 0,13°C za desetiletí a očekává se, že tento trend bude stoupat až k hodnotám 0,2°C v příštích desetiletích. Zvýšení teploty o 1°C přitom může snížit výnosy některých plodin až o 10%. Např. u pšenice došlo v letech 1980-2008 k poklesu produkce o 5,5% v souvislosti se zmíněnými teplotními trendy (Lobell et al., 2011). Je proto zřejmé, že změny klimatu a především teploty mohou významným způsobem ovlivnit produktivitu rostlin.

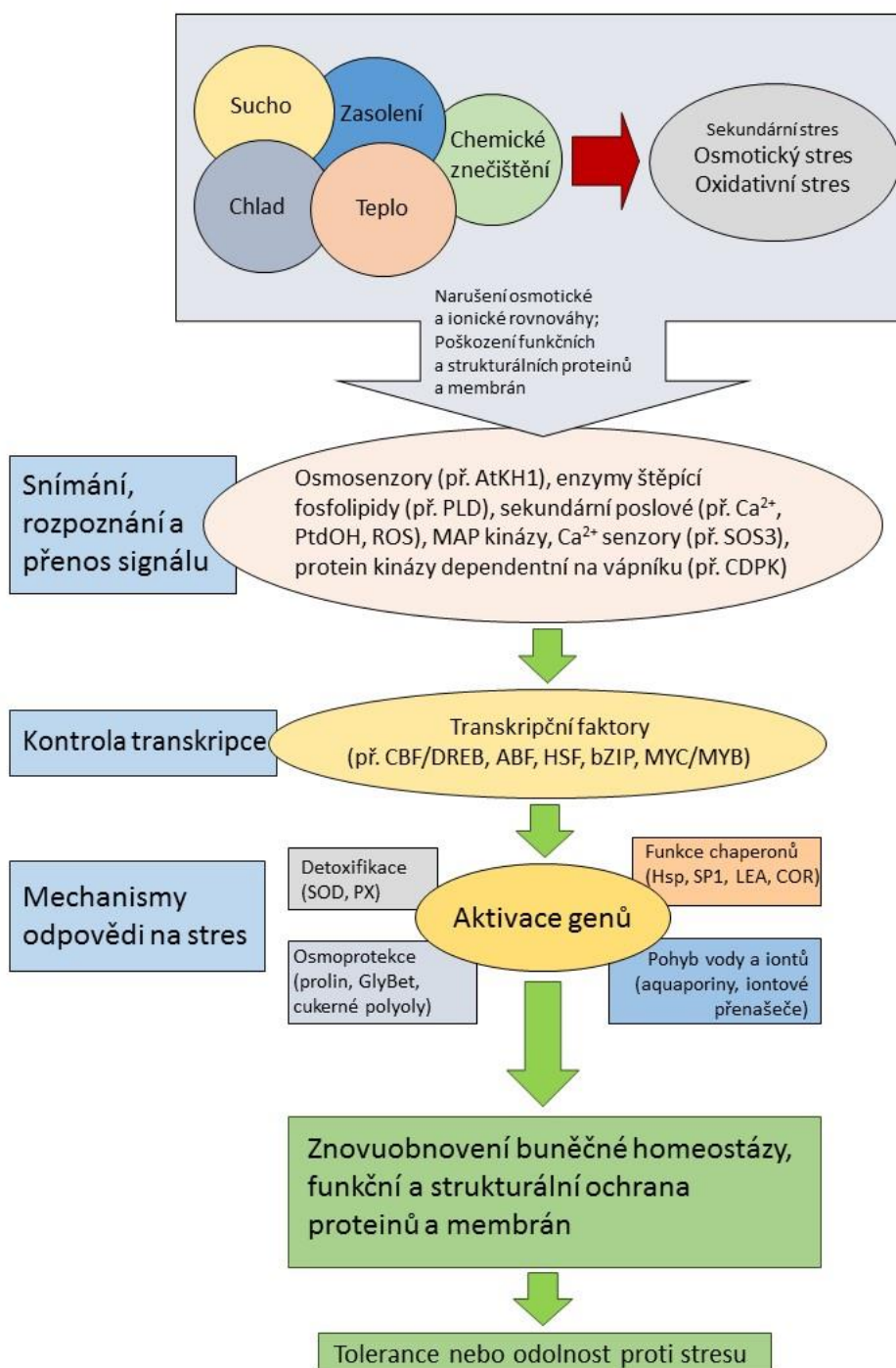
### **2.3.1 Fyziologické odpovědi rostlin na stres**

Stres je z biologického pohledu definován jako „vnější faktor, který vykazuje nepříznivý vliv na rostlinu“ či alternativně jako „signifikantní odchylka od optimálních životních podmínek“. Obecně jsou uvažovány 3 fáze stresu na rostlinu: 1) poplachová fáze, 2) fáze odolnosti a 3) fáze vyčerpání. Někdy je přidávána čtvrtá „fáze regenerace“ a to v případě, že je stresor odstraněn dříve, než dojde k vážným poškozením a může dojít k částečné či úplné regeneraci fyziologických funkcí. Na počátku poplachové fáze, kdy začíná samotná stresová reakce, reagují rostliny na stresor poklesem fyziologických funkcí, jako je výkon fotosyntézy, transport a akumulace metabolitů či příjem a translokace iontů (Lichtenthaler H. K., 1996).

Samotné vnímání stresoru je velmi komplexní, rostliny mají proto vyvinuto množství mechanismů. Jednou z možností je snímání buněčné vodní homeostázy díky izolaci histidinové kinázy hybridního typu z *Arabidopsis thaliana*, která se jeví jako experimentální důkaz osmosenzorů ve vyšších rostlinách. I přesto, že některé fyziologické odpovědi se mohou u jednotlivých stresů lišit, u většiny dochází k narušení fotosyntézy a to působí změny v bioenergetickém stavu rostliny. Proto jsou důležitým ukazatelem také cukry generované fotosyntézou a metabolismem uhlíku v tkáních systému „zdroj – sink“ (Duque et al., 2013).

### **2.3.2 Signalizace v reakci na abiotický stres**

Mnoho abiotických stresů je vzájemně propojeno, a proto mohou způsobovat podobná buněčná poškození (Obr. 10). Například sucho a zasolení jsou vnímány jako osmotický stres, což vyústí v porušení homeostázy a distribuce iontů v buňce. Oxidační stres naopak často doprovází stres vysokými teplotami, zasolením či suchem a může způsobit denaturaci funkčních a strukturních proteinů. V důsledku toho různé environmentální stresy často aktivují podobné signální dráhy a buněčné odpovědi (Wang et al., 2003).



Obr. 10: **Rostlinné reakce na abiotický stres;** *Primární stresy jsou často propojeny a způsobují buněčná poškození a sekundární stres. Počáteční stresové signály (př. osmotické a iontové jevy, změny fluidity membrány) spouští následné signální procesy a kontrolu transkripce, která aktivuje mechanismy odpovědi na stres pro znovuzískání homeostázy a ochranu a opravu poškozených proteinů a membrán. Neadekvátní odpověď v jednom či několika krocích v signalizaci a aktivaci genů může nakonec vést k nevratným změnám buněčné homeostázy a ve zničení funkčních a strukturálních proteinů a membrán, což vede k buněčné smrti. (Wang et al., 2003)*



Při objasňování signálních mechanismů v odpovědi rostlin na abiotický stres se nabízí jako nástroje bioinženýrství specifické stresem regulované geny. Ty můžeme rozdělit na a) geny zahrnuté v signálních kaskádách a v kontrole transkripce, do nichž patří MyC a MAP kinázy a SOS kináza, fosfolipázy a transkripční faktory jako HSF, CBF/DREB a ABF/ABAE rodiny; b) geny fungující přímo v ochraně membrán a proteinů, jako jsou proteiny teplotního šoku (HSPs), chaperony a LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteiny, osmoprotektanty a lapače volných radikálů a na c) geny zahrnuté v příjmu a transportu vody a iontů jako např. aquaporiny a iontové transportéry.

### 2.3.2.1 *Senzory*

Externí stresové signály jsou na počátku vnímány receptorovými proteiny a následně jsou předány cílovým signálním elementům. Jedním z typů sensorových proteinů jsou **receptorům podobné kinázy** (RLKs – *receptor-like kinases*) s nejzastoupenější rodinou RLK s na leucin bohatými opakováními (LRR-RLKs – *leucine-rich repeat RLKs*). Mimo regulování značného množství růstových a vývojových procesů se RLK podílí taky na stresových homeostatických reakcích a hrají hlavní roli v integraci environmentální a hormonální signalizace. Mezi členy RLK rodiny podílející se na stresové signalizaci patří např. RPK1 (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE1), jejíž exprese byla indukována ABA, dehydratací, zasolením a nízkou teplotou; CRK36 (CYSTEINE RICH RLK), která slouží jako negativní regulátor v osmotickém stresu a ABA signalizaci; PERK4 (PROLINE-RICH EXTENSIN-LIKE) je kináza aktivovaná pomocí ABA a  $\text{Ca}^{2+}$ ; a GHR1 (GUARD CELL HYDROGEN PEROXIDE RESISTANT1) (Osakabe et al., 2013).

Další skupinou senzorů jsou **histidinové kinázy** (HK), které byly původně identifikovány jako součást dvou komponentního signálního systému u bakterií a kvasinek, kde přenášely signály na následné regulátory odpovědi. V rostlinách se podílí mimo odpovědi k environmentálním stimulům, jako je sucho, zasolení a chlad, také ve vnímání rostlinných hormonů jako jsou etylen a cytokiny. V genomu *Arabidopsis* je identifikováno 8 HK, z toho se jich 5 podílí na hormonální signalizaci (Osakabe et al., 2013). Mezi nehormonálními receptorovými HK byla identifikována AHK1 jako unikátní osmosenzor, který je pozitivním regulátorem v signalizaci osmotického stresu a reguluje následné geny jak v závislosti tak nezávislosti na ABA

(Tran et al., 2010). AHK5 lokalizovaná v plasmatické membráně byla identifikovaná jako regulátor zavírání průduchů v odpovědi na ROS ( $H_2O_2$ ). V současnosti se ukázalo, že funguje jako negativní regulátor odpovědi na zasolení při klíčení semen a růstu jak klíčících tak dospělých rostlin *Arabidopsis* (Pham et al., 2012).

### **2.3.2.2 Dráhy přenosu signálu v rostlinách vystavených environmentálnímu stresu**

Při vodnímu deficitu nebo stresu zasolením je v rostlinách snižován osmotický potenciál cytosolu a dochází k akumulaci kompatibilních solutů (př. prolin, glycin, betain, polyoly), aby došlo k redukci poškození buněčných stěn. Tyto osmolity také mohou chránit proteiny a snižovat efekt ROS, které vznikají v důsledku oxidačního stresu, k němuž může sekundárně docházet po ionickém či osmotickém stresu. Jako široce využívaný signální modul osmolarity se zdá být využívána **MAP kinázová kaskáda**. Tato kaskáda je vysoce konzervovaná ve všech eukaryotách a jsou odpovědné přenos signálu široké škály odpovědí. Bylo izolováno množství zástupců genových rodin kódujících mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) a jejich bezprostřední „upstream“ regulátory MAPK kinázy (MAPKK) a MAPKK kinázy (MAPKKK). MAPK systém přenáší signál specifickou fosforylací serin/threoninových zbytků cílových proteinových substrátů. Kaskáda začíná fosforylací MAPKKK přímo po vnímání stimulu, ta pak aktivovaná fosforyluje a aktivuje určitou MAPKK a ta pak fosforyluje a aktivuje MAPK. Aktivovaná MAPK je přenesena do jádra, kde fosforyluje a aktivuje specifické komponenty jako transkripční faktory, které indukují buněčné odpovědi (Knight a Knight, 2001; Chinnusamy 2003; Jenks a Hasegawa; 2005, Kaur a Gupta, 2005).

Jinou signální molekulou v reakcích na množství abiotických stresů je **cytosolický vápník  $Ca^{2+}$** . Změny v hladinách  $Ca^{2+}$  jak v prostoru, tak v čase může poskytovat určitou specifíčnost mezi signalizací abiotického stresu (Knight a Knight, 2001). Jedním z aspektů  $Ca^{2+}$  signalizace je kódování a dekódování signálu přenášeného různými  $Ca^{2+}$  propustnými kanály. Dekódování signálu je zprostředkováváno vápníkovými senzory, které (samy nebo proteinovou interakcí) modulují expresi genů a změny aktivity proteinů. Navýšení cytosolického  $Ca^{2+}$  v odpovědi na signál může být díky influxu vápníku z apoplastu nebo jeho uvolněním z intracelulárních zásob jako endoplasmatické retikulum, vakuoly, mitochondrie či jádro. Rozsah a kinetika akumulace  $Ca^{2+}$  během stresu je závislá na typu stresu, např. signál pomocí ABA ústí v mobilizaci

intracelulárních zásob  $\text{Ca}^{2+}$ , zatímco chladový stres je signalizován influxem extracelulárního vápníku (Jenks a Hasegawa; 2005). Během stresu dehydratací a zasolením se do zvýšení hladin vápníku zapojují inositol 1,4,5-trifosfátem ( $\text{IP}_3$ ) řízené  $\text{Ca}^{2+}$  kanály, což naznačuje roli  $\text{IP}_3$  a dalších sekundárních posílů zapojených do stresové signalizace (Chinnusamy 2003).  $\text{Ca}^{2+}$  signál je pak vnímán několika typy senzorů, jako jsou na vápníku závislé proteinové kinázy (CDPKs – calcium-dependent protein kinases), které jsou pravděpodobně zahrnuty v aktivaci transkripčních faktorů indukující expresi genů typu LEA, či SOS3 rodina vápník vázajících proteinů, které jsou součástí SOS (Salt-Overly-Sensitive) signální dráhy stresu zasolením (Knight a Knight, 2001; Chinnusamy et al., 2003).

V neposlední řadě je během abiotického stresu zvýšena biosyntéza **kyseliny abscisové (ABA)**, která je rychle metabolizována stimuluje expresi mnoha genů reagujících na stres. ABA je regulační molekulou podílející se na toleranci k suchu a její hlavní funkcí je regulovat toleranci k osmotickému stresu pomocí genů tolerance k buněčné dehydrataci a regulovat vodní bilanci pomocí svěracích buněk. ABA je též indukována stresem zasolením a v menší míře také chladovým stresem (Kaur a Gupta, 2005). Současný model ABA signalizace zahrnuje 3 klíčové komponenty: receptory (PYR/PYL/RCAR), proteinové fosfatázy (PP2C), které se chovají jako globální negativní regulátory ABA, a proteinové kinázy (SnRK2/OST1) regulující ABA pozitivně (Cramer et al., 2011).

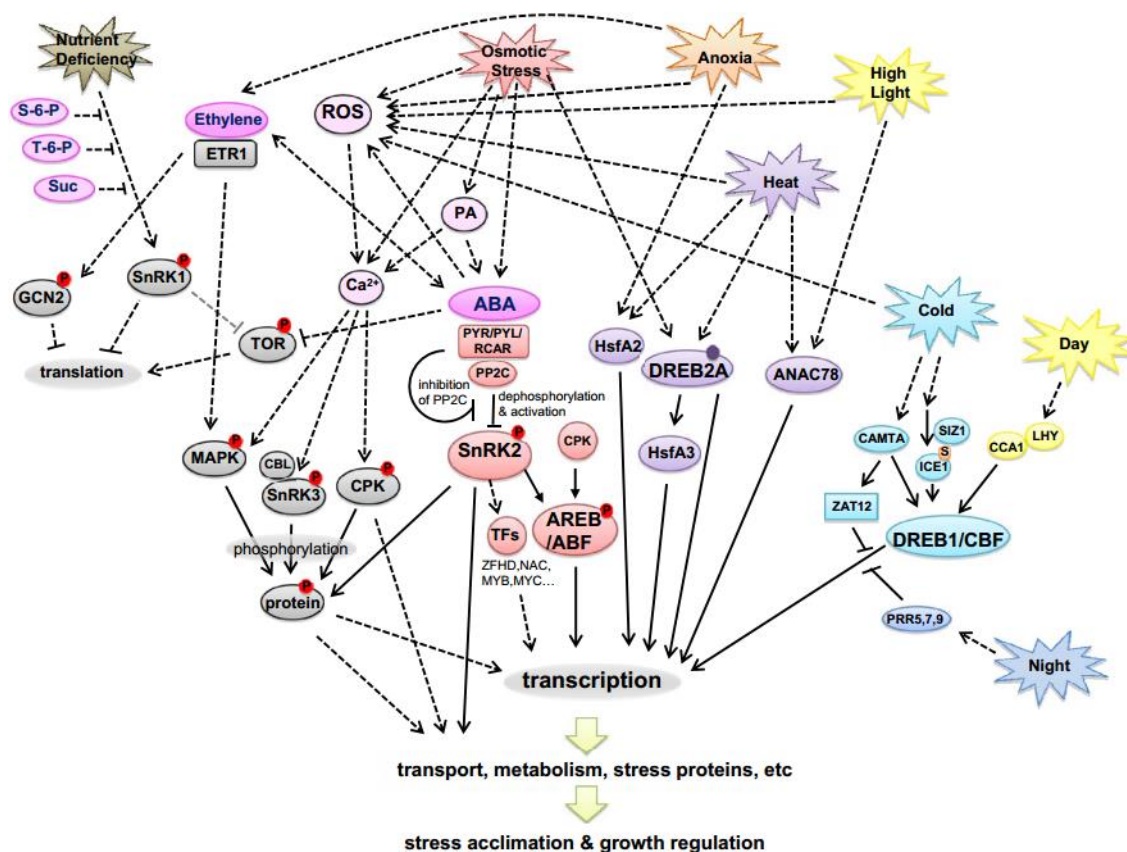
### ***2.3.2.3 Transkripční faktory aktivované v odpovědi na abiotický stres***

Rostlinné genomy obsahují velké množství transkripčních faktorů (TF), např. u *Arabidopsis* téměř 5,9% genomu kóduje více jak 1500 TF patřících do několika různých multigenových rodin. Deset specifických rodin z těchto TF jsou zahrnuty v odpovědi na abiotický stres a to rodiny AP2/EREBP, ABI3/VP1, ARF, bHLH, bZIP, HB, HSF, MYB, NAC a WRKY. Jednotliví členové stejné rodiny mohou odpovídat rozdílně na různé stresové stimuly, ale na druhou stranu některé na stres reagující geny mohou sdílet ty samé TF (Wang et al, 2003). V odpovědi na abiotický stres jsou aktivní minimálně 4 specifické regulony. Dva z nich, DREB1/CBF (dehydration-responsive element binding protein 1/C-repeat binding factor) a DREB2, fungují v expresi genů independentní na ABA. Naopak v expresi genů v závislosti na ABA funguje regulon ABRE/ABF (ABA-responsive element (ABRE) binding protein/ ABRE binding factor).

K těmto hlavním drahám se pak v expresi genů v závislosti na stresu připojují další regulony jako NAC (NAM/ATAF1/CUC2) a MYB/MYC (Myeloblastosis-myelocytomatosis) regulony (Shanker a Venkateswarlu, 2010).

ABRE/ABF transkripční faktory jsou exprimovány v široké škále abiotických stresů, jako je chlad (ABF1, ABF4), zasolení (ABF2, ABF3) či sucho (ABF3, ABF 4). MYC/MYB faktory se akumulují pouze po předchozí akumulaci ABA. DREB1 TF jsou indukovány chladovým stresem, kdežto DREB2 jsou indukovány během stresu suchem a zasolením. Přestože jsou jednotlivé rodiny DREB regulovány v odpovědi na různé stresy, regulují stejný DRE *cis*-element (Lata et al., 2011).

Povaha signální dráhy pro abiotický stres je proměnná a vysoce závislá na druhu, orgánu, pletivu, buněčném typu, vývojovém stádiu rostliny či samotném stresu či kombinaci stresů, které rostlinu ovlivňují, jejich intenzitě a délce působení. Stále neznáme mnoho receptorů a jejich aktivních míst, a přestože známe množství následných procesů (transkripčních drah), zatím je jen málo známo o primární signalizaci. Velké množství literatury spoléhá na transkriptomickou analýzu, která však mnohdy není dostatečná kvůli mnohdy nízkým korelacím mezi transkriptomickými a proteomickými profily či aktivitou enzymů. Díky stále rostoucímu množství studií věnujících se této problematice se však mezery v signalizační dráze odpovědi na abiotický stres u rostlin začínají zaplňovat (Obr. 11) (Cramer et al., 2011).



Obr. 11: Zjednodušený model signalizace v reakci rostlin na abiotický stres; Ovály představují proteiny, metabolity nebo procesy. Metabolity jsou znázorněny purpurovou barvou. Fosforylované proteiny jsou označeny červeným kruhem s písmenem P. Fialové ovály představují procesy, kde je pro aktivaci vyžadována modifikace DREB2. Plné šipky reprezentují přímé spojení, přerušované pak nepřímé spojení (prostřednictvím nějaké intermediální molekuly). V diagramu nejsou zahrnuty všechny spojení a detaily efektů stresu a hormonů pro zachování jednoduchosti modelu. Zkratky: ABA (kyselina abscisová), ANAC (Arabidopsis NAC domain-containing protein), CAMTA (calmodulin-binding transcription activator), CBL (calcineurin B-like interacting protein kinase), CCA (circadian clock associated), CPK (calcium-dependent protein kinase), DREB/CBF (dehydration response element binding protein/C-repeat binding factor), ETR1 (ethylene response 1), GCN2 (general control non-repressible 2), HSF (heat shock factor), ICE (inducer of CBF expression), MAPK (mitogen-activated protein kinase), LHY (late elongated hypocotyl), PA (kyselina fosfatidová), PP2C (protein phosphatase 2C), PRR (pseudo response regulator), PYR/PYL/RCAR (ABA receptors), RNS (reactive nitrogen species), ROS (reactive oxygen species), SIZ (SAP and Miz domain protein), SnRK (sucrose nonfermenting-1 related kinase), TFs (transkripční faktory), TOR (target of rapamycin), ZAT (zinc finger protein). (Cramer et al., 2011).

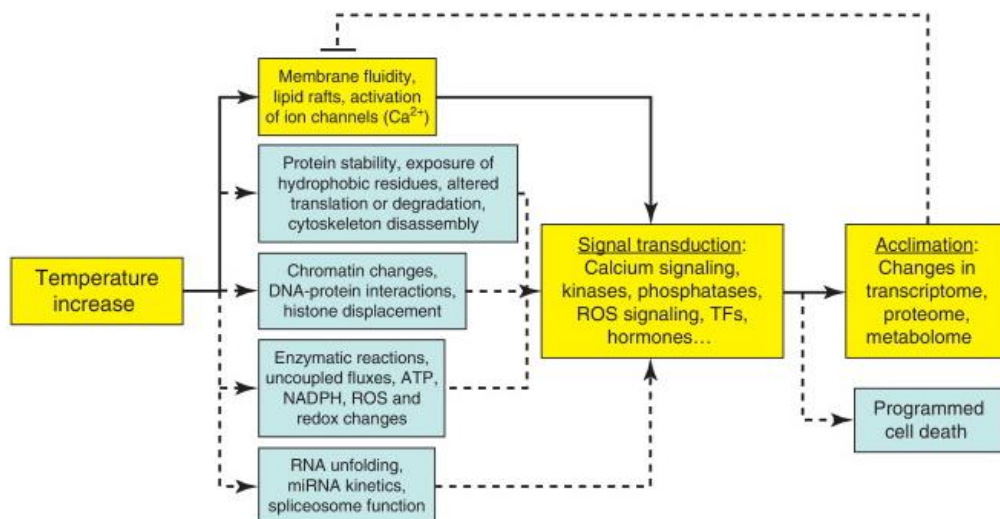
## 2.4 Vnímání teploty v rostlinách

Teplota je jedním z klíčových environmentálních faktorů, které dalekosáhle ovlivňují metabolismus, vývoj a růst rostliny. Suchozemské rostliny musí čelit kontinuálním změnám teplot v průběhu dne i ročních období. Aby zabránily poškození, musí být rostliny schopny včas reagovat na teplotní výkyvy na molekulární úrovni. Poznání těchto procesů nabývá ještě větší důležitosti s klimatickou změnou (Penfield, 2008).

Z významných fyziologických pochodů teplota ovlivňuje velmi výrazně především fotosyntézu, kterou příliš vysoké teploty omezují mnohem více než by se očekávalo pouze z hlediska stimulace fotorespirace. V současnosti je předpokládán nejen nárůst oxygenasové aktivity RuBiSCO (ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa; EC 4.1.1.39) oproti reduktasové při vysokých teplotách, ale také přímá regulace fotosyntézy teplotním stresem na membráně thylakoidů (Sharkey, 2005).

Přestože jsou na vysokou teplotu náchylné všechny rostlinné pletiva, reprodukční orgány jsou na teplotní výkyvy obzvláště citlivé a již nárůst o pár stupňů během času kvetení může mít za výsledek ztrátu celého životního cyklu (Mittler et al., 2012).

Tradiční koncept vnímání vysokých teplot rostlinami byl založen na skutečnosti, že vysoké teploty denaturují proteiny a toto je pak podnětem pro indukci specifických proteinů tepelného šoku (HSPs) chovajících se jako molekulární chaperony pomocí dráhy známe jako reakce na tepelná šok (HSR). Rostoucí množství pokusů však ukazuje, že velké množství stresových reakcí působí indukci těchto proteinů i bez přiměřené denaturace bílkovin (Horváth, 2012). Navíc pouze malá frakce transkriptomu nadregulováno v odpovědi na zvýšené teploty kódovala teplem indukované chaperony. Zbytek transkriptů kódoval produkty zahrnuté v signalizaci vápníkem, fosforylaci proteinů, signalizaci fytohormonů, signalizaci a metabolismu lipidů a cukrů, metabolismu RNA, translaci, primárním a sekundárním metabolismu, regulaci transkripce a odpovědích na další různé biotické a abiotické stresory (Rizhsky et al., 2004) To vede k hypotéze, že odpověď na vyšší teploty je mnohem komplexnější a velkou roli hrají už fyzikální a strukturální vlastnosti membrány a tok iontů vápníku (Obr.12).



Obr. 12: Schematický model vnímání teploty v rostlinách. Mírné změny v teplotě mohou ovlivňovat vlastnosti membrány a aktivovat vápníkové kanály. Následující přítok vápníku pravděpodobně aktivuje události přenosu signálu a mění metabolismus rostlin v procesu zvaném aklimace. Tato dráha (zvýrazněný žlutě a plnými šipkami) může sloužit jako primární teplo snímající mechanismus rostlin. Další teplotou vyvolané změny zahrnují změny ve stabilitě proteinů a expozici hydrofobních zbytků proteinů, které mohou spustit UPR senzory v cytosolu a ER, vypuzení histonů z jádra (které uvolní cestu pro TF vázající se na HSR geny), akumulace ROS a změny v hladinách buněčné energie a rozložení druhů RNA, které mohou jednat jako riboswitches či ovlivňovat spliceosom nebo funkce miRNA. Tyto dráhy (zvýrazněné modře) se předpokládá, že spouští různé signální akce a přispívají k tepelné aklimaci. Alternativou k aklimaci je programovaná buněčná smrt, která by mohla být spuštěna na základě spojení několika drah přenosu signálu a podmínek. Předpokládá se, že aktivace vápníkové signalizace kanálem v plasmatické membráně umožňuje spuštění dalších od senzorů odvozených drah. (Mittler et al., 2012)

#### 2.4.1 Role membrány ve vnímání teploty

V současné době přestávají být biologické membrány vnímány pouze jako místo prvního poškození extrémními teplotami. Zdá se, že jsou schopny vnímat změny prostředí a na dálku aktivovat stresové obranné geny jako důsledek rychlé změny jejich fyzického stavu a organizace mikrodomén. Vhodným modelem pro studium chování membrány je fotosyntetizující cyanobakterie *Synechocystis*, které mají obecné uspořádání a lipidová kompozice membrán podobné jako ve vyšších rostlinách (Glatz, 1999).

Při poklesu teploty ustává pohyb komponent modelu fluidní mozaiky a tak se membrána stává více rigidní. Použití mutantů v genech pro desaturázy mastných kyselin (FAD – fatty acid desaturase), což jsou enzymy kontrolující nenasycenost fosfolipidů, mimikuje změny ve fluiditě membrány způsobené nízkou teplotou a dokonce zvyšují

inducibilitu mnoha chladem nadregulovaných genů. Řada pokusů ukazuje, že zvýšená rigidita membrány je pravděpodobně snímána s membránou asociovanými proteiny a ty pak slouží jako regulátory řady následných procesů v odpovědi na nízké teploty (Ruelland a Zachowski, 2010). Zdá se, že jeden typ rozpustné histidinové kinázy Hik 19 a histidinové kinázy asociované s membránou Hik 33 jsou zapojeny do vnímání a přenosu signálu nízkých teplot snížením exprese genů pro desaturázy. Navíc se mutant v genu pro Hik 33 ukázal být citlivý na stres přílišným světlem za normálních teplot a v kombinaci s dalšími pokusy se ukazuje, že se Hik 33 podílí na vnímání stresu zasolením, hyperosmotického stresu a stresu peroxidem vodíku, což by mohlo napovídat, že tato histidinová kináza by mohla být obecným stresovým senzorem (Horváth, 2012).

Při vnímání vysokých teplot se ukázalo, že změny fyzikálních vlastností tylakoidních membrán (jako fluidita a organizace lipidových mikrodomén) mění profil a teplotní práh indukce většiny genů tepelného šoku. To napovídá, že teplotní práh aktivace hsp-genů není fixní hodnotou, ale je ovlivněná teplotou okolí v době růstu rostliny (Horváth, 2012). Je-li rostlina vystavena mírně zvýšeným teplotám, dojde k specifickému přeuspořádání kompozice mastných kyselin, aby došlo k ochraně životně důležitých procesů související s membránou prevencí její nadměrné fluidity. Saily et al. (2010) zjistili, že rostliny *P.patens* pěstované při 32°C při analýze celkových mastných kyselin vykazaly snížení hladin polynenasycených mastných kyselin, hlavně mezi C16 a C18 mastnými kyselinami. Pozorování změn profilů jednotlivých typů mastných kyselin naznačovalo, že jednotlivé typy mají specifické role v zachování optimálních funkcí membrány. Při vyšších teplotách jsou membrány obohacovány o více nasycené mastné kyseliny, čímž se zvyšuje rigidita membrány a tím optimalizují s membránou spojené procesy za teplotního šoku (Saily, 2010). Použití sloučeniny zvyšující fluiditu membrán – benzylalkoholu (BA), které snížilo molekulové uspořádání jak cytoplasmatických tak tylakoidních membrán, dramaticky snížilo teplotní práh aktivace genů teplotního šoku (Horváth, 1998). Genetická manipulace s poměrem nasycených mastných kyselin a nenasycených mastných kyselin měla prokazatelný vliv na transkripci genů *hsp70* a *hsp82*, což potvrzuje hypotézu vlivu uspořádání membrány na expresi genů HSP. Snížení uspořádanosti membrány tylakoidů *Synechocystis* ať teplotou či použitím BA zvyšovalo termosenzitivitu membrány a tím pozměnilo HSR. Mezi uspořádáním membrány thylakoidů



a prahovými teplotami maximální aktivace všech hlavních genů teplotního šoku je tedy blízká korelace (Vigh, 1998).

#### **2.4.2 Signální lipidy a teplotní stres**

Při působení vysokých teplot dochází k tomu, že se v membránách rychle akumulují klíčové signální lipidy: fosfatidylinositol-(4,5)-bisfosfát (PIP<sub>2</sub>), kyselina fosfatidová (PA) a and myo-inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) (Mittler et al., 2012).

PIP<sub>2</sub> je jedním z nejprostudovanějších fosfolipidů, za nestresujících podmínek je ale pouze minoritním komponentem buněčných lipidů. Teplotní stres však indukuje jejich rapidní akumulaci a to 5 až 6 násobně během 30 min stresové periody a lokalizace nárůstu PIP<sub>2</sub> odpovídá jeho potenciální funkci (Mishking et al, 2009). PIP<sub>2</sub> má totiž v membráně vícero funkcí; je hlavním koordinátorem endocytózy, reguluje velké množství membránových kanálů, iontových pump a jiných integrálních proteinů a také moduluje dynamiku aktinu interakcemi s proteiny na aktin se vázajícími. Proto v rostlinách dochází k masivní reorganizaci cytoskeletu jako raný důsledek teplotního stresu (Horváth, 2012).

Zvyšování hladin PIP<sub>2</sub> a PA je zapříčiněno hlavně jejich novou syntézou než snižováním jejich metabolických přeměn lipázami či fosfatázami. Vysoké teploty aktivují fosfatidylinositol-fosfát kinázu (PIPK) odpovědnou za zvyšování hladin PIP<sub>2</sub>; na syntéze PA se podílí diacylglycerol kinázy (DGK) či fosfolipáza D (PLD). Rychlá indukce těchto enzymů po počátku teplotního šoku naznačuje, že regulace jejich aktivity v odpovědi na nárůst teploty se objevuje post-translačně (Horváth, 2012),

Propojení mezi primárním teplotním senzorem a fosfolipidovými signálními pochody, které následují po teplotním stresu, stále ještě nejsou identifikovány. Zvýšení aktivity PIPK a PLD může být sekundárním důsledkem akcí iniciovaných nárůstem cytosolického Ca<sup>2+</sup>. Alternativně se může fosfolipidová signalizace objevit s těmito událostmi paralelně.

#### **2.4.3 Specifický tok vápníku**

Nedávná studie Saily et al. 2009 sledující rané pochody během vnímání tepla v mechu *Physcomitrella patens* ukazují, že po zvýšení teploty dojde k rychlému a přechodnému specifickému influxu vápníku zvyšujícího jeho cytosolickou hladinu zahájeného na plasmatické membráně. Amplituda vápníkového influxu byla

proporcionálně úměrná intenzitě aplikovaného teplotního šoku a určovala, do jaké míry proběhne následná syntéza HSP (Saidy et al, 2009). Podobný vzestup hladiny vápníku byl pozorován také u buněk tabáku po působení tepla, což napovídá, že by toto mohlo být součástí vysoce konzervovaného mechanismu vnímání vysoké teploty mezi suchozemskými rostlinami (Gong, 1998).

Byly objeveny neselektivní teplotou indukované iontové kanály zprostředkovávající přítok  $\text{Ca}^{2+}$ , které byly aktivovány již v rozmezí vteřin po změně teploty nebo po aplikaci BA. Teplotou i BA aktivované kanály si byly velmi podobné ve vodivosti a iontové selektivitě a obě spustily velké (přestože přechodné) zvýšení cytosolického vápníku. BA způsobilo mnohem vyšší nárůst  $\text{Ca}^{2+}$  než teplota, což může být dáno jeho mnohem většími účinky na mikrodomény membrány a její fluiditu (Saidy, 2009). První minuty po nárůstu teploty jsou tedy obzvláště stěžejní. Průchod vápenatých iontů přes plasmatickou membránu v této počáteční fázi se stal jádrem správné indukce HSP. Deset minut zpoždění dostupnosti  $\text{Ca}^{2+}$  v průběhu prvních 30 minut teplotního šoku  $38^\circ\text{C}$  snížila na polovinu účinek  $\text{Ca}^{2+}$  a následnou HSR a termotoleranci, přestože ostatní na vápníku závislé signální dráhy stresových reakcí zůstaly nedotčeny (Horváth et al., 2012).

Pokusy Saidy et al. také potvrzují, že přestože je  $\text{Ca}^{2+}$  univerzálním sekundárním poslem podílejícím se v řadě signálních drah na různé biotické i abiotické vlivy (Reddy et al., 2011), je teplotou aktivovaný  $\text{Ca}^{2+}$  influx odpovědný za aktivaci specificky genů odpovědi na teplotu, což naznačuje že v membráně funguje paralelně několik kanálů pro různé stresy. Také farmakologické uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z kompartmentů se nepodílelo na HSR, což naznačuje, že kolísajícího koncentrace volného vápníku v cytoplasmě se nepodílí na signalizaci a spíše lokální interakce u vstupujícího vápníku udělují teplotnímu signálu specifitu (Saidy, 2009).

Teplotním stresem indukovaný influx vápníku reguluje několik signálních drah. V *A. thaliana* jsou do reakce na teplotu zapojeny kalmoduliny (CaM) a mohou být zapojeny do aktivace různých transkripčních faktorů jako jsou WRKY39 a HSF. Přítok vápníku také aktivuje několik na vápníku závislých protein kináz (CPDKs), které zase mohou aktivovat různé mitogenem aktivované protein kinázy (MAPKs) nebo ROS produkující enzymy. Kalmoduliny také aktivují kalmodulin vázající kinázu (CBK), která fosforyluje členy HSF rodiny. Také fosforylace klíčového transkripčního faktoru základní termotolerance, MBF1C, který funguje v dráze nad DREB transkripčními

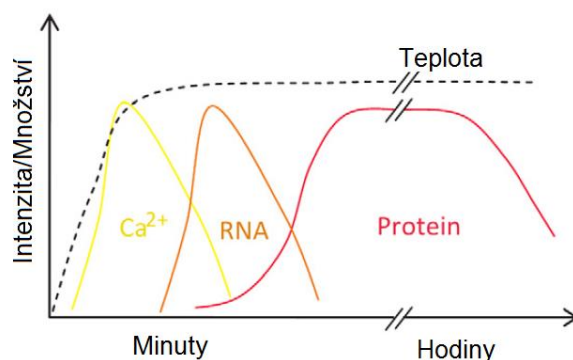
aktivátory a některými HSF může být přímým či nepřímým výsledkem aktivace CPDK (Mittler et al., 2012).

Kalmodulin je důležitým meziproduktem vápníkem zprostředkovaných přenosů signálů. V kukuřici byla objevena specifická vazebná místa pro CaM v rámci cytoplasmatických HSP70, na něž se CaM vázal v závislosti na  $\text{Ca}^{2+}$ . V přítomnosti rostoucí hladiny cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  se zvyšovala i hladina mRNA CaM a CaM spolu s  $\text{Ca}^{2+}$  podporovali expresi HSP genů a syntézu HSP proteinů. V rostlinách bylo objeveno několik různých genů kódujícími četné isoformy CaM, u *Arabidopsis* je to 9 CaM genů (AtCaM1-9). Množství těchto izoform napovídá, že budou odpovídat na rozdílné stimuly či regulovat rozdílné cílové proteiny v rozdílných  $\text{Ca}^{2+}$  signálních kaskádách. Při experimentech působení teplotního šoku ( $37^{\circ}\text{C}$ , 20 minut) se výrazně exprimovaly geny AtCaM3 a AtCaM7, přičemž první zmíněný se rapidně akumuloval již po prvních 5 minutách teplotního šoku a jeho hladina dosáhla maxima po 20 minutách, zatímco AtCaM7 se akumuloval výrazně až po 10 minutách stresu. AtCaM3 je tedy pravděpodobně zapojen v brzkých signálech ovlivňujících expresi HSP genů (Hong-Tao, 2005).

#### 2.4.4 Proteiny teplotního šoku

V *P. patens* vystavenému kontinuálnímu teplotnímu stresu se syntéza HSP indukovala pouze v prvních hodinách. A stejně jako v případě influxu  $\text{Ca}^{2+}$ , byla navzdory přetrvávajícím vysokým teplotám syntéza HSP *de novo* potlačena a bylo potřeba 5 hod. zotavení za nestresujících teplot, aby byla obnovena plně schopnost další silné reakce na teplotní šok a syntéze HSP, navzdory jejich zvýšeným hladinám. (Saidy, 2009). Toto nám napovídá, že chaperony hrají méně významnou roli v brzkých událostech reagujících na teplotní stres, než se původně předpokládalo. Odpověď na teplotní šok je tedy přechodná a postupná. Po bezprostředním přílivu  $\text{Ca}^{2+}$  následuje přechodná syntéza mRNA, která poté vede k přechodné expresi proteinů (Obr. 14).

Množství HSP, které je indukováno v *P. patens* teplotním šokem, nezávisí pouze na indukční teplotě, ale také na základní růstové teplotě. Pokud byly mechy aklimatizované při  $22^{\circ}\text{C}$  vystaveny 1 h působení teplot  $34^{\circ}\text{C}$ , tak vykazaly čtyřikrát vyšší reakci na teplotní šok (HSR) v porovnání s mechy aklimatizovanými při  $30^{\circ}\text{C}$ . Toto koreluje s podstatným nárůstem v saturaci membránových lipidů při  $30^{\circ}\text{C}$  oproti  $22^{\circ}\text{C}$  (Horváth, 2012)



Obr. 13: Schematické znázornění postupných událostí objevujících se v buňce po soustavné expozici mírnému nárůstu teploty. Zvýšení teploty okamžitě spouští rychlé a přechodné zvýšení cytosolické koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Následně se vyskytne přechodná syntéza mRNA různých HSP a vyústí v přechodnou expresi proteinů trvající v řádu hodin. (Horváth et al., 2012)

Genomy vyšších rostlin obsahují okolo 300 genů kódujících molekulární chaperony, ko-chaperony a foldasy. Teplotní šok může v *Arabidopsis* nad-regulovat okolo 1300 genů, pouze 90 z nich však patří do vysoce konzervovaných rodin molekulárních chaperonů. Všech pět reprezentativních HSP je součástí vysoce konzervovaných ubikvitárně distribuovaných proteinových rodin (Finka et al., 2011).

Proteiny teplotního šoku zahrnují Hsp100/ClpB, Hsp90/HtpG, Hsp70/DnaK, Hsp60/GroEL a malé HSP (sHSP) proteiny. Rodiny těchto HSP genů jsou v rostlinách velmi komplexní, a protože je velké množství z nich esenciální pro normální růst a vývoj je těžké odhalit jejich role během stresů. Nejvíce prostudovanými jsou Hsp100/ClpB a sHSP (Kotak, 2009).

HSP100/ClpB proteiny jsou členy AAA+ rodiny ATPáz a jsou zapojeny do rozpouštění proteinových agregátů. Proteiny z této rodiny lokalizované v cytosolu jsou u rostlin nezbytné pro toleranci k vysokým teplotám, jejich chloroplastové homology se ukázaly být potřebné pro správný vývoj chloroplastů (Kotak 2009).

sHSP patří do rodiny chaperonů, která jsou definována konzervovanou doménou karboxy-konce okolo 90 aminokyselin, uvedenou jako  $\alpha$ -krystalinová doména. Je dosud nejkompexnější skupinou HSP v rostlinách a podílí se na ochraně prakticky všech buněčných kompartmentů. *In vitro* se sHSP vážou na částečně rozložené proteiny na ATP nezávislým způsobem a tím zabraňuje jejich nevratné agregaci. Během teplotního šoku jsou dramaticky akumulovány transkripty všech hlavních sHSP, specifické sHSP jsou také exprimovány během vývoje a také některých jiných stresů (Kotak, 2009).

Nadexprese chloroplastových sHSP (ch-sHSP) v *Arabidopsis* a rajčeti podala důkaz, že tyto sHSP chránili fotosystém II před oxidačním stresem způsobeným vysokými teplotami, což napovídá, že by ch-sHSP mohly fungovat jako antioxidanty za podmínek oxidačního stresu využíváním svých konzervovaných methioninů k vychytání reaktivních druhů kyslíku (Horváth, 2012).

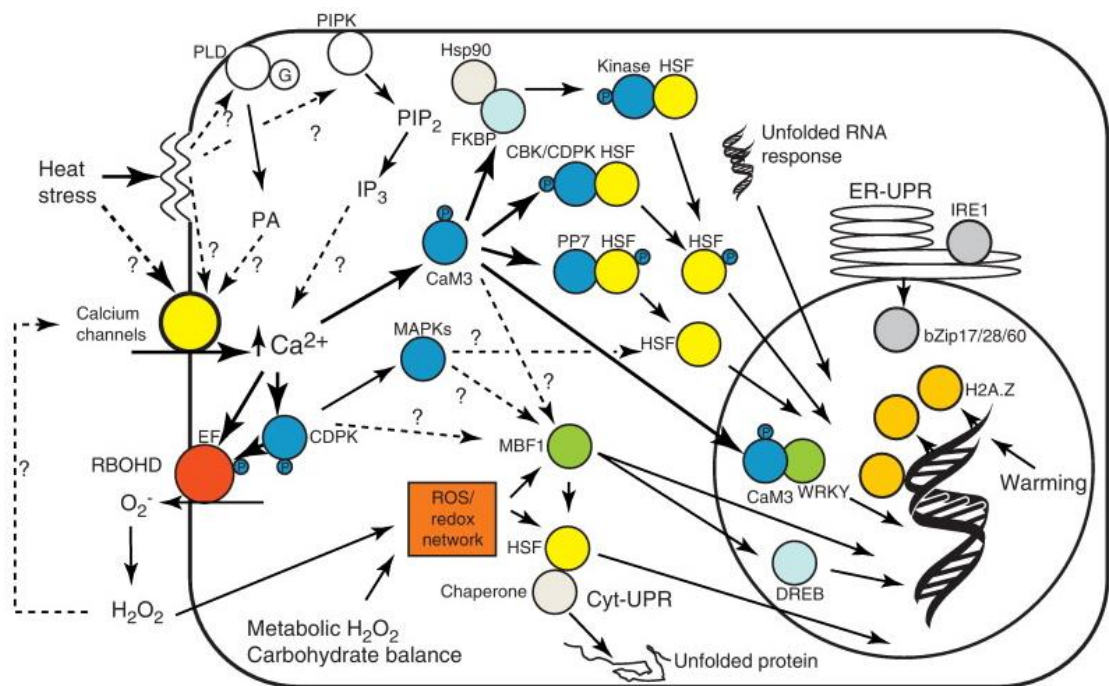
#### 2.4.5 Další mechanismy

V reakci zvýšenou teplotu dochází ještě k mnoha dalším pochodům. Jedním z nich je teplotou indukovaná, rychlá a přechodná stimulace produkce peroxidu vodíku  $H_2O_2$ . Podobný nárůst peroxidu vodíku může být vyvolán fluidizací membrány pomocí BA. Tento vysokou teplotou indukovaný  $H_2O_2$  se ukázal být nezbytným pro efektivní expresi HS genů v *Arabidopsis*. Je tedy raným komponentem signální dráhy vnímání tepla a rychle reaguje na změny fluidity membrány (Königshofer et al, 2008).

U *Synechocystis* byla paralelně s reorganizací thylakoidních mikrodomén v závislosti na teplotě pozorována také zvýšená hladina vysoce nasyceného monoglukosyldiacylglycerolu (MGlcDG). Ten můžeme považovat za „lipid tepelného šoku“, díky jeho schopnosti stabilizace membrán v ranných fázích reakce na teplotu, která je zajištěna jeho řetězci vysoce nasycených mastných kyselin a unikátní schopnosti selektivně interagovat (a tím pádem ukotvovat) sHSP. MGlcDG syntáza je asociována v membráně a zvyšuje svoji aktivitu po vzrůstu teploty, proto může být v kontextu proteinem vnímajícím vysoké teploty. Její aktivace kontrolována fluiditou membrány může být rychlejší a efektivnější odpovědí než transkripční/translační nadregulace či kovalentní modifikace (Balogi et al, 2005).

Studie Kumar a kolektivu (2012) předkládá roli nukleozomů jako na teplotu odpovídajících regulátorů transkripce. Při zkoumání mutantů *A.thalianna* s narušeným vnímáním tepla byl identifikován gen APR6, který kóduje podjednotku SWR1 komplexu, jež je nezbytný pro vložení alternativních histonů H2A.Z do nukleozomů namísto histonů H2A. Nukleozomy obsahující H2A.Z obalují DNA pevněji než kanonické H2A nukleozomy a mají také silnější intranukleosomální interakce. Mutanti bez genu ARP6 měli snížený obsah H2A.Z vázaných v chromozomech. Transkriptom *arp6* mutantů kultivovaných při 12°C byl podobný standardním (wild-type) rostlinám pěstovaným na 12°C a přenesených na 27°C, což naznačuje, že nukleozomy obsahující H2A.Z mohou modulovat transkripci v závislosti na teplotě. Za nízkých teplot jsou

H2A.Z nukleozomy více zastoupeny a mohou bránit transkripci blokáci místa pro RNA polymerázu nebo potlačení aktivace transkripčních faktorů. U genů exprimovaných specificky za nízké teploty mohou pak bránit vázání represorů nebo antagonizovat DNA metylaci. Po zvýšení teploty dochází k dramatickému snížení množství H2A.Z v nukleozomech, což může vést ke zvýšené expresi teplotou indukovaných genů jako *HSP70*. Snížení exprese některých genů pak může odpovídat uvolnění místa pro vazbu represoru po uvolnění H2A.Z nukleosomu (Kumar a Wigge, 2010).



Obr. 14 Signální dráhy aktivované v reakci na tepelný stres u rostlin. Tepelný stres ovlivňuje stabilitu membrány a aktivuje vápníkové kanály, což vyústí v přítok vápníku (vlevo). Změny v membránové stabilitě také může spustit lipidovou signalizaci přes lipidy modifikující enzymy PLD a PIPK. Vápník váže kalmodulin  $CaM3$  a aktivuje množství kináz či transkripčních faktorů HSR, jako jsou HSF, MBF1c, WRKY a DREB. Zvýšená hladina cytosolického  $Ca^{2+}$  také aktivuje ROS produkující enzym RBOHD lokalizovaný na plasmatické membráně (vlevo dole). ROS derivovaný RBOHD (př. superoxid  $O_2^-$ , který je konvertován na  $H_2O_2$ ) může působit depolarizaci membrány či vstoupit do membrány a spustit ROS/redox signální dráhu. Dvě UPR dráhy jsou znázorněny v modelu, jedna v cytosolu (Cyt-UPR) a jedna v ER (ER-UPR). Cyt-UPR funguje prostřednictvím HSF, kdežto ER-UPR využívá sensorovou molekulu IRE1 a transkripční faktory bZip17, bZIP28 a bZIP60. V jádře teplo snižuje množství H2A.Z na promotérech HSP (vpravo). (Mittler et al., 2012)

## 2.5 Interakce mezi signální dráhou světla a teploty

Světlo a teplota jsou jedny z nejdůležitějších signálů pro růst a regulaci rostliny, které mimo svého přímého energetického efektu také zajišťují okamžité a prediktivní podněty pro zajištění optimálního rozvoje jak časově tak prostorově. Oproti signálním drahám světla, které jsou již relativně dobře definovány, je molekulární charakterizace vnímání teploty mnohem těžší. V současnosti roste množství předpokladů, že teplota a světlo mají propojené signální dráhy a je známo množství uzlů, kde se jednotlivé dráhy setkávají.

Jedním z příkladů vzájemné interakce světla a teploty je ne-fotochemická nebo také temná reverze fytochromu, z biologicky aktivního Pfr na biologicky neaktivní Pr formu. Temná reverze byla pozorována v mnoha fytochromech mnoha druhů a PfrPr heterodimery vykazovaly značně rychlejší reverzi jak PfrPfr homodimery. Tento proces je silně závislý na teplotě a reverze rychleji probíhá za vyšších teplot. Temná reverze PhyB zahrnuje cílenou fosforylaci specifického serinového zbytku na N-konci PHYB proteinu (Franklin et al., 2014).

Teplota růstu také může ovlivňovat relativní funkční hierarchii jednotlivých fytochromů. Heschel a kolegové pozorovali na mutantech *Arabidopsis* deficientních v kombinacích fytochromů roli jednotlivých fytochromů na klíčení. Zjistili, že při nízké teplotě (10°C) přebírá dominantní roli phyE, následován phyB. Při vysoké teplotě (28°C) byl hlavním regulátorem phyB, následován phyA a phyE, kdežto při průměrné teplotě (19°C) neměla ztráta phyA, phyB a phyE téměř žádný vliv na klíčení, což podpořilo nové role phyC a/nebo phyD. Též se zdá, že se může lišit temná reverze za různých teplot pro různé rodiny fytochromů (Heschel et al., 2007).

Teplota ovlivňuje též kryptochrom a fototropiny. Funkce kryptochromu v závislosti na teplotě byla pozorována při regulaci času kvetení. U mechů bylo pozorováno, že k nízkou teplotou řízenému přesouvání chloroplastů z periklinální na antiklinální buněčnou stěnu je potřeba fototropin pho2 (Franklin et al., 2014).

Signální dráhy světla a teploty se sbíhají v několika sdílených následných regulátorech. Jedním z nich je transkripční regulátor PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4), který je společným bodem signálních drah regulujících reakci úniku ze stínu (tzv. „shade avoidance“) a aklimace k vysoké teplotě. PIF jsou podskupinou bazických helix – smyčka – helix (bHLH) transkripčních faktorů, které interagují přímo s fytochromem. Při přechodu na zvýšenou teplotu

dochází k přechodnému zvýšení hladiny transkriptu PIF4 a také se zvyšuje fosforylace PIF4, což naznačuje, že zvýšené post-translační modifikace se podílí na zvýšené aktivitě PIF4 za těchto podmínek (Stavang et al., 2009; Foreman et al. 2011). Důležitou duální funkci limitující PIF zprostředkovaný prodloužený růst v nízkém poměru R:FR a vysokých deplotách má LONG HYPOCOTYL IN FAR RED (HFR1). Mutanti deficientní v genu HFR1 měli přehnaný prodloužený růst, což naznačuje, že HFR1 funguje jako negativní regulátor úniku ze stínu. HFR1 váže PIF4 a PIF5, čímž omezuje jejich DNA vázání a transkripční aktivitu a výrazně tak limituje aktivitu PIF4 v teplém prostředí (Foreman et al. 2011; Franklin et al., 2014). Dalším sdíleným transkripčním faktorem je ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5), který hraje centrální roli v podpoře rostlinné fotomorfogeneze a navíc moduluje signalizaci phyA negativní regulací transkriptu jeho jaderného transportního proteinu. Mimo fotomorfogeneze hraje také důležitou roli v signalizaci nízké teploty. HY5 reguluje asi 10% chladem indukovaných genů a méně jak polovina z nich byla také indukovaná světlem, což ukazuje, že HY5 reguluje jak odlišné tak překrývající se regulony. Hladina HY5 se na nízké teplotě zvyšovala a HY5 samotný se chová jako pozitivní regulátor chladové aklimace (Catala et al., 2011).



## 3 MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 Rostlinný materiál a jeho kultivace

Pro studium interakcí teplotního šoku, snížené intenzity světla a snížené hladiny cytokininů v proteomu byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) nesoucí transgen *CaMV35S>GR>HvCKX2* na pozadí Col-0 s nadprodukcí enzymu CKX z ječmene (*HvCKX2*), které je dosaženo dexamethasonem (DEX) indukovanou expresí (Šámalová et al., 2005) genu *CKX2*.

Semena *Arabidopsis thaliana* byla po povrchové sterilizaci (75% ethanol, cca 5-7 min) vyseta v biohazard-boxu (Aura vertical S.D.4, Bioair instrument) na sterilizované síťky v Petriho miskách (12,5 × 12,5 cm) na živné 1× Murashige – Skoogovo médium (Duchefa) s 1,2% agarem (Duchefa), jehož pH bylo upraveno na 7,8 pomocí 1 M KOH a po sterilizaci byla média obohacena o 10 μM dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma). Misky s vysetými semeny byly 3 dny ponechány v lednici při 3-4°C pro eliminaci dormance a synchronizaci líčení. Poté byly misky vertikálně umístěny do kultivačního boxu. Klíčící rostliny byly kultivovány po dobu 7 dnů při dvou světelných podmínkách: 1) nízké intenzitě světla 20 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> a 2) standardní intenzitě světla 80 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> v režimu dlouhého dne (16 hod./21 °C světlo; 8 hod./19 °C tma).

### 3.2 Indukce teplotního stresu

V 5. dnu kultivace byly rostliny přeneseny na nové MS medium obsahující 10 μM DEX či opět DMSO (kontrola). Po uplynutí 48 hodin od aktivace pomocí DEX byly rostliny podrobeny tepelnému stresu teplotou 35 °C po dobu 0, 15, 30 a 180 minut. Dále byl proveden experiment pro sledování zotavení rostlin 120 min po tepelném stresu 35 °C, 60 min. Rostliny byly následně ihned zmrazeny v tekutém dusíku a do analýzy skladovány při -80 °C.

### 3.3 Izolace celkového proteomu s odstraněním Rubisco

Vzorky o hmotnosti 150-180 mg byly homogenizovány za pomoci tekutého dusíku a extrakce celkového proteomu byla provedena pomocí 0,5 ml pufru TBST (10 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) s přidavkem 7-8 μl inhibitorů proteáz (SigmaAldrich) a PVPP (polyvinylpyrrolidon, Sigma-Aldrich). Centrifugací byla odstraněna nesolubilizovaná část (5min, 20 000 rpm, 4 °C) a extrakt byl přenesen na

kolonku Seppro IgY-Rubisco Spin Column (Sigma-Aldrich) a zpracován podle instrukcí výrobce. Ze vzorků po imunochemickém odstranění Rubisco byl vysrážen celkový protein pomocí TCA/acetonové extrakce (Tab. 1; Damerval et al., 1986).

<b>Roztok A</b>	200 ml aceton
ke vzorku přidáno 8 ml, přes noc při -20°C	20 g TCA (kyselina trichloroctová)
	140 µl 1,2-merkaptóetanol
centrifugace: (15 min, 25 000 g, 4 °C); resuspendace peletu v roztoku B	
<b>Roztok B</b>	200 ml aceton,
ke vzorku přidáno 8 ml; 1 hod při -20°C	20 g TCA
	140 µl 1,2-merkaptóetanol
	149 mg EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)
centrifugace: (10 min, 25 000 g, 4 °C); resuspendace peletu v roztoku C	
<b>Roztok C</b>	200 ml aceton
ke vzorku přidáno 8 ml	140 µl 1,2merkaptóetanol
centrifugace: (5 min, 25 000 g, 4 °C); odebrání supernatantu a odpaření na rotační vakuové odparce (SpeedVac System)	
<b>Solubilizace v SOL roztoku</b>	7 M močovina (0,40 g/ml)
přidáno 200 ml na 5 mg vzorku	2 M thiomočovina (0,16 g/ml)
	2% CHAPS (0,02 g/ml)
	90mM dithiothreitol (0,01 g/ml)
solubilizace proteinového extraktu, 2 hod při 30°C	
<b>IPG</b>	20 ml SOL
přidání IPG pufru v poměru 1:1	200 ml 1% směs amfolytů pH 3-10
k solubilizovanému vzorku	40 ml 0,2% bromfenolová modř

Tab. 1: Postup extrakce a solubilizace celkového proteomu Arabidopsis

### 3.4 Izoelektrická fokusace, SDS-PAGE a digitalizace obrazu

Rozpuštěný proteom byl rehydratován na IPG stripy v množství 150 µg proteinu na strip (7cm, nelineární gradient pH 3-10, Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com/>) po dobu 16 hodin. Poté byly vzorky podrobeny izoelektrické fokusaci na (22 °C; 150V 20 min, 300 V 20 min, 600 V 20 min, 1500 V 20 min, 3000 V 20 min a 4000 V stoupající na

12000 V za hodinu; PROTEAN IEF Cell Unit; Bio-Rad) a následně ošetřeny puftrem obsahujícím iodacetamid a DDT (Sigma-Aldrich) k redukci a alkylaci proteinů. Celkový proteom vzorků byl poté rozdělen pomocí SDS-PAGE (dodecylsírán sodný v gradientovém 8-20% polyakrylamidovém gelu; 100 V 10 min a 150 V 60 min; Mini-PROTEAN 3 Dodeca Cell; Bio-Rad). Gely byly poté třikrát promyty destilovanou vodou a obarveny koloidní Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad). Obarvené gely byly promyty destilovanou vodou a naskenovány kalibrovaným Densitometrem GS-800 s rozlišením 700dpi (Bio-Rad).

### **3.5 Analýza obrazu gelů**

Gely byly analyzovány Decodon Delta 2D softwarem (<http://www.decodon.com/>), kde míra signifikance byla nastavena při hodnotě T-testu  $\geq 95\%$  na  $\pm 1,4$  (hodnota poměru relativního objemu proteinových spotů aktivovaný:kontrolní vzorek). Porovnávána byla sada 3 gelů pro každý vzorek ve 2 technických opakováních. Regulace byla považována za signifikantní, pokud se shodně projevila alespoň ve 2 biologických opakováních.

### **3.6 Digestce proteinů v gelech**

Signifikantně pozměněné spoty byly vyřezány vždy minimálně z 10 gelů a promyty destilovanou vodou. Následovalo promytí v 50% acetonitrilu (10 min) a 100% acetonitrilu (10 min). Spoty byly vysušeny na vakuové odparce (SpeedVac) a digestovány 0,1  $\mu\text{g}$  modifikovaným trypsinem (<http://www.promega.com/>) v 10  $\mu\text{l}$  25 mM hydrogenuhličitanu amonného na jeden vzorek (přes noc, při 37 °C). Výsledné peptidy byly extrahovány 15 minutovou sonikací v 20  $\mu\text{l}$  0,1% TFA (kyselina trifluoroctová), a následně opětovnou 15 minutovou sonikací v 50  $\mu\text{l}$  60% acetonitrilu v 0,1% TFA a vysušeny.

### **3.7 Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie**

Vysušený vzorek byl rozpuštěn v 20  $\mu\text{l}$  směsi 5% ACN a 0.08% TFA. Následně byla směs peptidů analyzována pomocí LC-MS (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 RSLCnano, Bruker Daltonics) za aplikace 5  $\mu\text{l}$  vzorku na analýzu na lineárním gradientu 4-40% ACN (acetonitril) za 30 min na koloně Ascentis Express Peptide ES-C18 (Supelco). Předrozdělené peptidy byly ionizovány pomocí elektrospreje a analyzovány na Bruker amaZon speed ETD ion trap. Získaná hmotnostní spektra byla

porovnána s databází TAIR 10 pomocí softwaru Mascot 2.4.0. (<http://www.matrixscience.com/>). Detailní nastavení analýzy LC-MS/MS a porovnání s databází viz Příloha 1.

### **3.8 Vyhodnocení dat**

Pro vizualizaci proteinových profilů, nalezení trendů a korespondenční analýzu bylo využito programu J-Express (<http://jexpress.bioinfo.no/site/>).

Informace o funkci proteinů byla získána z databází UniProt (<http://www.uniprot.org/>), TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) a portálu iHOP (<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>).

Informace o lokalizaci proteinů byla určena pomocí databáze UniProt a SUBA (<http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/>).

Informace o vzájemných proteinových interakcích byla získána pomocí programu String 9.1 (<http://string-db.org/>).

Informace o zapojení proteinů do vývojových drah byla získána pomocí databáze KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo zjistit vliv snížené hladiny endogenních cytokininů a rozdílné intenzity světla na signalizaci rostlin modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* v odpovědi na abiotický stres na úrovni proteomu. Doba působení teplotního stresu byla zvolena tak, aby byly zaznamenány změny v proteomu v krátkodobé odpovědi (15 a 30 min.), což je časový interval se změnami nepostižitelnými v mRNA, a v dlouhodobé odpovědi (180 min.), kdy již proteinová odpověď na teplotní stres vychází z nové translace proteinů. Dále byla provedena varianta sledující zotavení a možnou aklimaci k teplotnímu stresu.

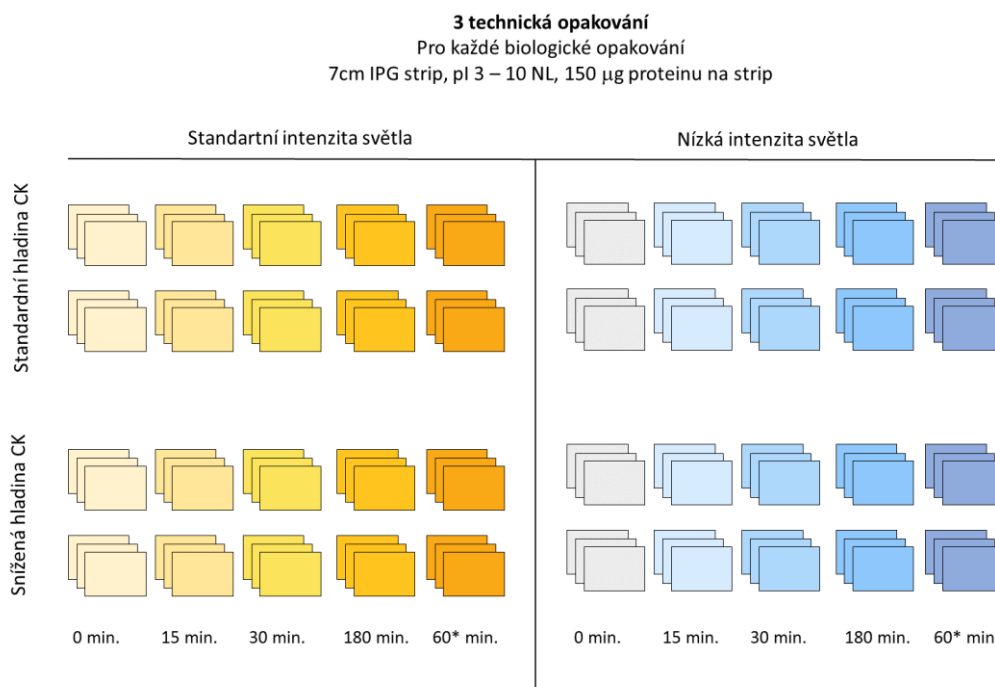
Signální dráhy pro světlo a cytokininy jsou evidentně provázány, což potvrzovaly i předchozí studie ÚMBR, kdy mezi proteiny v brzké odpovědi na cytokininy bylo nalezeno množství proteinů anotovaných svou funkcí v reakci na světlo a množství fotosyntetických pochodů se světlem spojených (Černý et al., 2011). Propojení cytokininů a světla je předpokládáno již od samotného objevení cytokininů, kdy byla popsána podobnost mezi efekty CK a světla na klíčení semen a expanzi listů u salátu (Miller et al., 1956). Změny objevující se v etiolizovaných klíčcích rostlinách v odpovědi na světlo, tzv. fotomorfogeneze, můžou být částečně napodobeny růstem klíčcích rostlin za přítomnosti exogenních cytokininů nebo zvýšením hladiny endogenních cytokininů (Lochmanová et al., 2008). Bylo ukázáno, že tyto změny závisí na AHK2 a AHK3 receptorech (Riefler et al., 2006). Dále byl pozorován efekt cytokininů na fytochromy, které jsou mediátory mnoha světelných reakcí. Cytokininové regulátory typu A ARR4 stabilizují aktivní Pfr formu fytochromu PhyB a chovají se tak jako pozitivní regulátor PhyB (Sweere et al., 2001). ARR4 tedy pravděpodobně fungují jako přímý molekulární spínač integrující signály červeného světla a cytokininů. Degradace cytokininů pomocí CKX je spojena s odpovědí na zastínění u *Arabidopsis thaliana*. Rostliny rostoucí pod zastíněním získávají malý poměr červeného/dalece červeného světla (red/far red – R/FR). Vystavení tomuto nízkému poměru R/FR vede k rapidnímu nárůstu auxinové signalizace, která vede k vzrůstu exprese CKX (Argueso et al., 2009). Zapojení dvou různých intenzit světla v experimentu spolu s rozdílnými hladinami endogenních cytokininů má tedy za úkol sledovat jejich vzájemnou interakci v odpovědi na teplotní šok u *Arabidopsis*.

V neposlední řadě je velmi významná role cytokininů ve světle pro funkci chloroplastů, protože modulují výkonnost fotosyntézy. Navíc mají cytokininy vliv na samotnou strukturu chloroplastů. Při vývoji chloroplastů z proplastidů během přechodu

ze tmy na světlo mohou cytokininy uspíšit diferenciaci prolamelárního tělíska do typické lamelární struktury a toto je doprovázeno zvýšenou syntézou chlorofylů. Klíčnými rostlinami rostoucími bez cytokininů mají malé etioplasty a obsahují jen prolamelární tělíska oproti rostlinám rostoucím za přítomnosti cytokininů, které měly prolamelární tělíska větší, čočkovitého tvaru a s již vyvinutými strukturami bi-thylakoidních membrán. Cytokininy tedy podporují formaci thylakoidních membrán. Mimo jiné také působí nadměrné kupení gran a zvýšený obsah škrobu. Rostliny obsahující snížený obsah cytokininů obsahovaly jen málo škrobových zrn a měly redukované vrstvení gran. Normální hladina cytokininů je tedy potřebná k vývoji řádných chloroplastů (Cortleven a Schmölling, 2015).

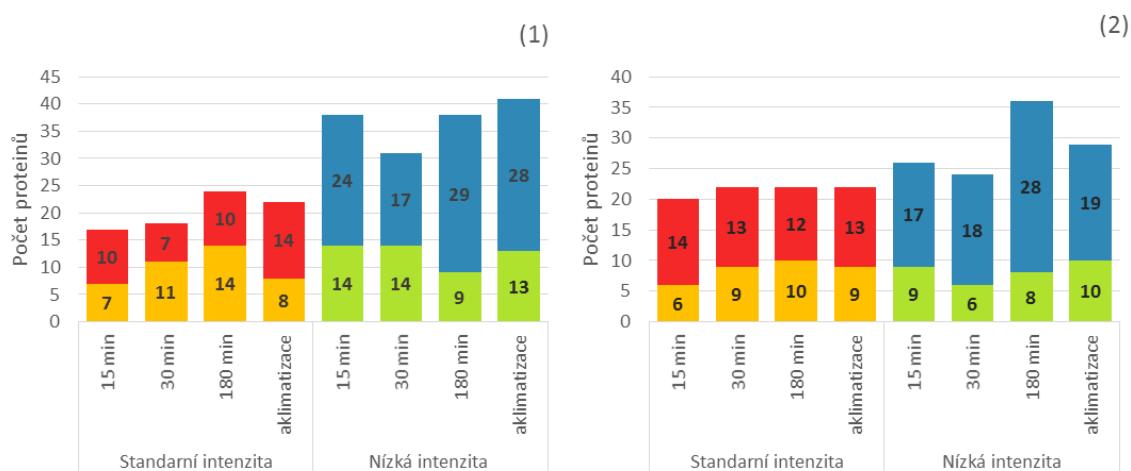
#### 4.1 Proteomická analýza

Pro sledování účinku teplotního stresu a změny intenzity světla na molekulární úrovni byla využita proteomická analýza. Efekt zvýšené teploty byl sledován v různých časových intervalech na rostlinách s nezměněnou a se sníženou hladinou cytokininů a na dvou světelných intenzitách. Pro analýzu byla použita metoda s deplecí abundantních proteinů, konkrétně Rubisco (viz. Materiál a metody) (Obr. 15).



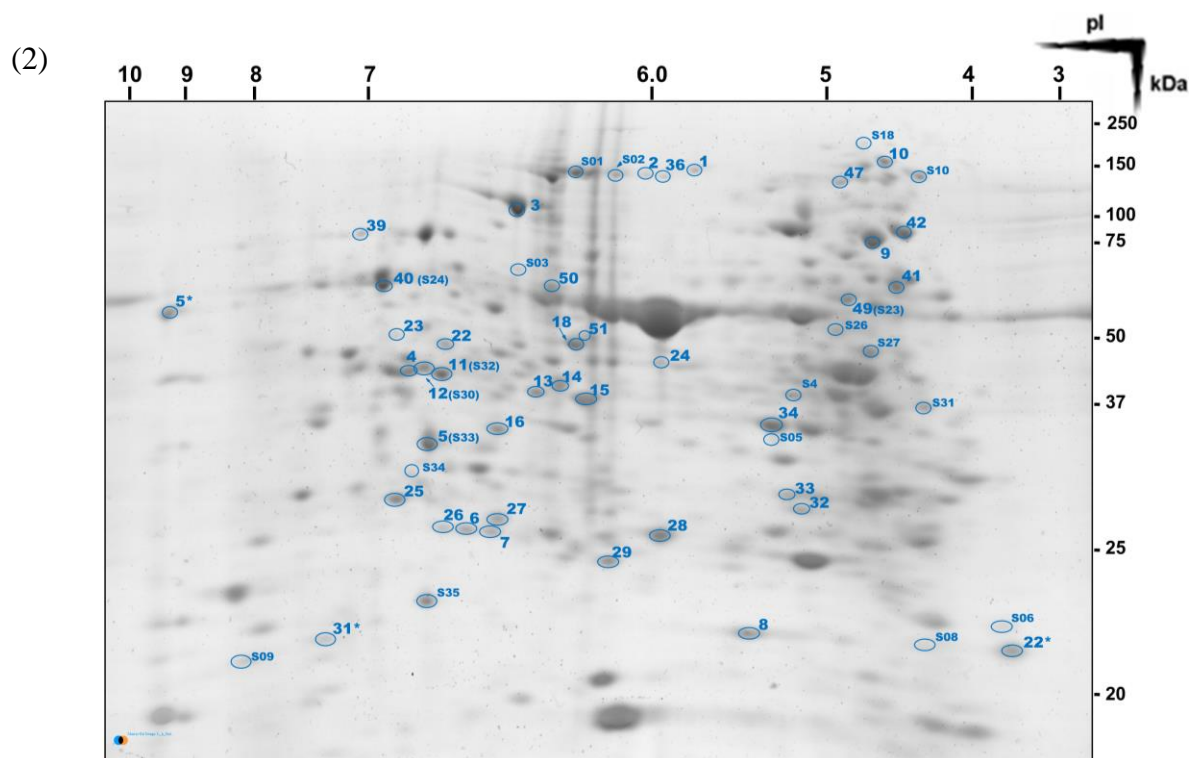
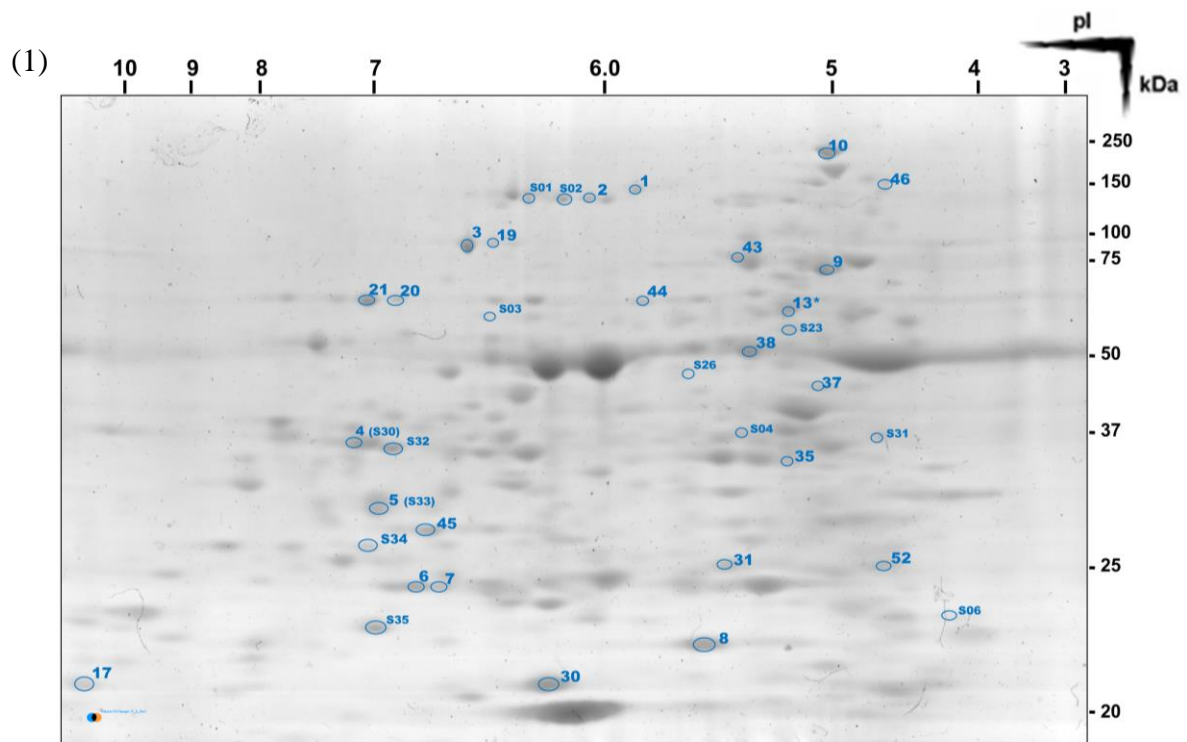
Obr. 15: Schéma 2D analýzy proteomu rostlin *Arabidopsis thaliana* za stresu vysokou teplotou

Celkově bylo nalezeno 416 proteinových spotů. Porovnáním relativních objemů proteinových spotů vzorek: kontrola (rostlina neošetřená DEX, 0 min tepelná šok) bylo nalezeno v proteomu rostlin pěstovaných na standardní intenzitě světla 25 spotů se signifikantně změněnou abundancí. U rostlin pěstovaných na nízké intenzitě světla bylo nalezeno 40 spotů se signifikantně změněnou abundancí. Spotů se změnou v abundanci na obou světelných intenzitách bylo nalezeno 10 (Obr. 16). Při porovnání s předchozím experimentem skupiny Černý et al. (2013) využívající stejnou transgenní linii *Arabidopsis* se podařilo najít 12 proteinových spotů, které měli změněnou abundanci v obou studiích a mohou tedy sloužit k obohacení výsledků.



**Obr. 17: Porovnání vlivu teploty a intenzity světla na proteom *A.thalianna*.** Počet zjištěných proteinových spotů se signifikantně změněnou abundancí u rostlin se standardní hladinou cytokininů (1) a s indukovanou sníženou hladinou cytokininů (2), kde žlutě jsou označeny proteiny s pozitivní změnou abundance a červeně s negativní změnou abundance na standardní intenzitě světla a obdobně zeleně jsou označeny proteiny s pozitivní změnou abundance a modře proteiny s negativní změnou abundance na nízké intenzitě světla.

Při porovnání proteinů se ukázalo, že větší množství proteinů má negativně změněnou abundanci, což značí pravděpodobnou degradaci oproti jejich nárůstu (tj. pozitivní změně abundance)(Obr. 17). Rozdíl mezi pozitivními a negativními změnami abundance byl mnohem vyšší na nízké intenzitě světla, jak u rostlin s normální tak se sníženou hladinou cytokininů. Na standardní intenzitě světla byl u kontrolních i aktivovaných rostlin poměr mezi pozitivně a negativně regulovanými proteiny podobný. Celkový počet nalezených proteinů je na nízké intenzitě světla vyšší, což napovídá, že odpověď rostliny na teplotu je za tmy výrazně vyšší než za světla (Černý et al., 2014).



Obr. 16: Účinky teplotního šoku na rostliny *Arabidopsis thaliana*. Ukázková mapa proteomu kontrolních rostlin pěstovaných na standardní intenzitě ( $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )(1) a snížené intenzitě světla ( $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )(2). 2D mapy získané rozdělením  $150 \mu\text{g}$  proteinu v rozsahu pI 3-10 a molekulové hmotnosti 10-250 kD vizualizované koloidní Bio-Safe Coomassie G-250. Označeny jsou jednotlivé signifikantně regulované proteinové spoty. S označením S jsou označeny spoty doplněné na základě porovnání s analýzou Černý et al. (2013).



## 4.2 Shluková analýza proteinů se signifikantně změněnou abundancí

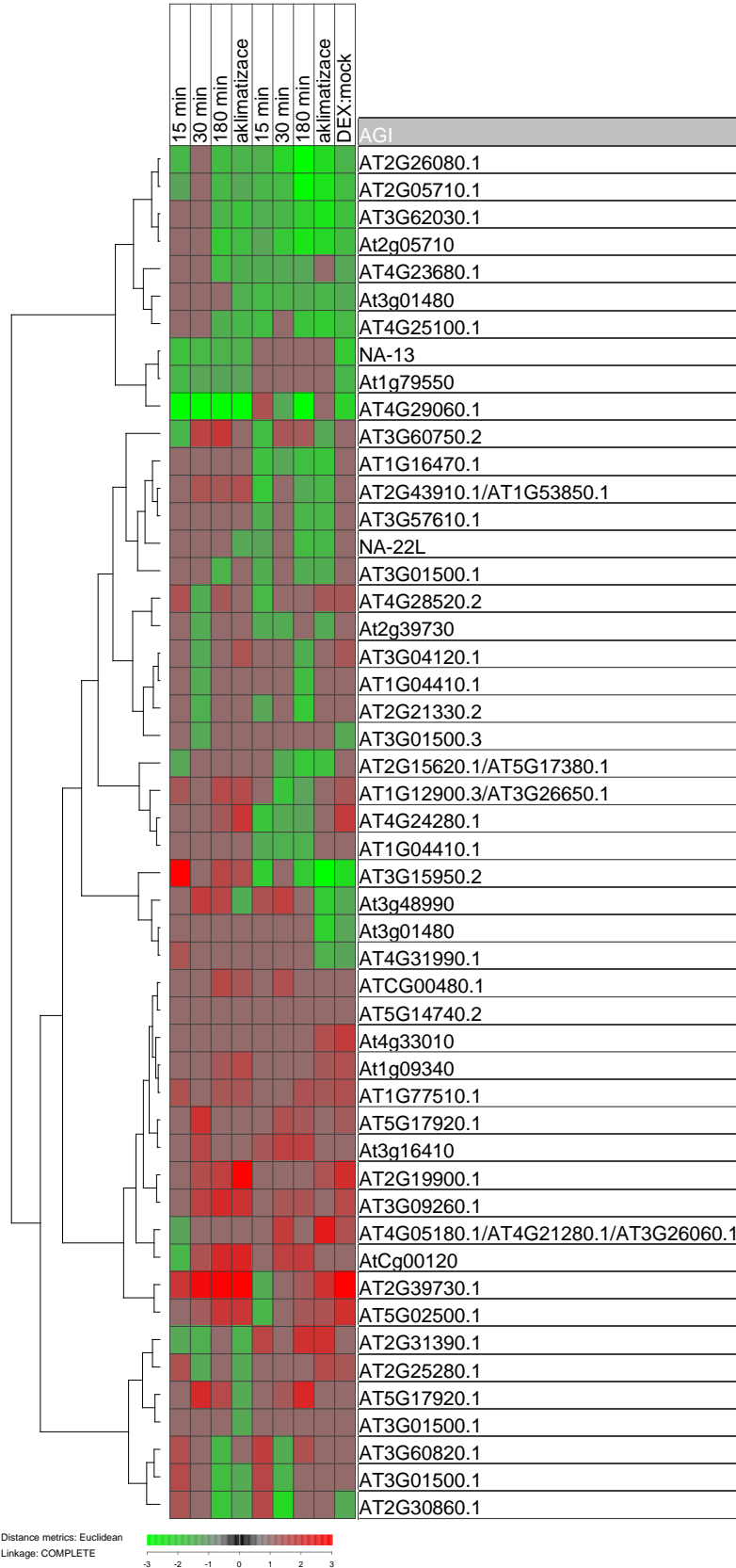
Výstup proteomických experimentů poskytuje velké množství dat, jejichž následné vyhodnocení a interpretace je často komplikované. S využitím moderních bioinformatických nástrojů lze docílit prvotního přiblížení výsledků, nalézt zajímavé spojení či navrhnout kandidáty vhodné na další sledování. Průběh odpovědi na teplotní stres v časech 15, 30 a 180 minut a varianty aklimace v čase 60 minut (vždy porovnáno proti kontrole - doba působení zvýšenou teplotou 0 minut) je znázorněn na teplotní mapě vygenerované pomocí programu J-Express (Obr. 18). Za statisticky významnou byla považována změna abundance, která vykazovala změnu relativního objemu proteinového spotu  $\pm 1,3$ . Statistická významnost byla řízena T-testem na hladině spolehlivosti 95%.

Na standardní intenzitě světla bylo nalezeno 6 proteinových spotů, u nichž se snížení hladiny cytokininů projevilo opačnou změnou abundance. Další 4 proteiny byly regulované jen v rostlinách se sníženou hladinou cytokininů a 2 proteiny pouze u rostlin s nezměněnou hladinou cytokininů.

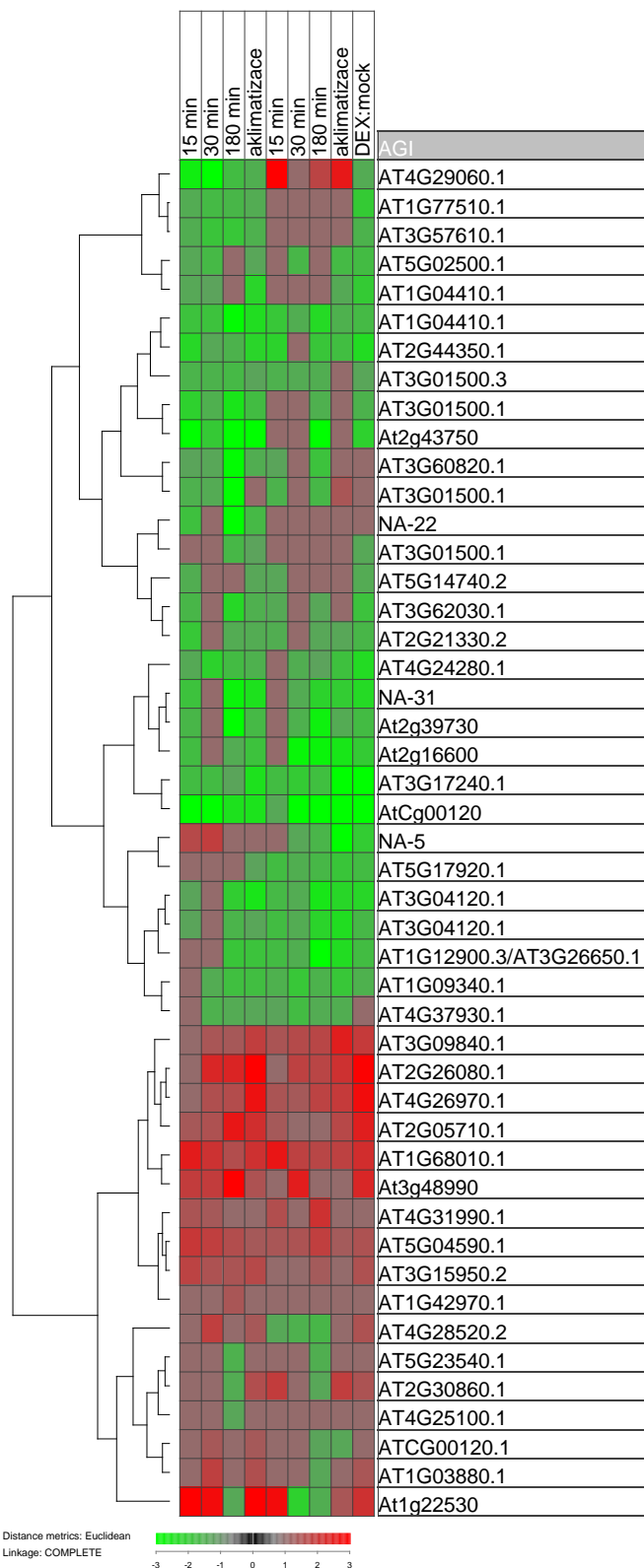
Na nízké intenzitě byly nalezeny 4 proteiny, které po snížení hladiny endogenních cytokininů vykazovali opačnou regulaci než rostliny neaktivované. Další 4 proteiny byly regulované jen u rostlin s nezměněnou hladinou cytokininů.

Bylo nalezeno 10 proteinových spotů se signifikantně změněnou abundancí obsahujících 11 proteinů (1 směs), které se vyskytovaly jak na standardní tak na nízké intenzitě světla. Byly nalezeny 4 proteiny, které měly na nízké intenzitě světla svůj objem regulovaný opačně, než tomu bylo na intenzitě standardní. U 3 proteinů byla změna intenzity světla patrná pouze u rostlin se sníženou hladinou endogenních cytokininů, kdy došlo k opačné regulaci než na intenzitě standardní. U zbylých 3 proteinů se profily proteinů nezměnily s intenzitou světla.

(1)

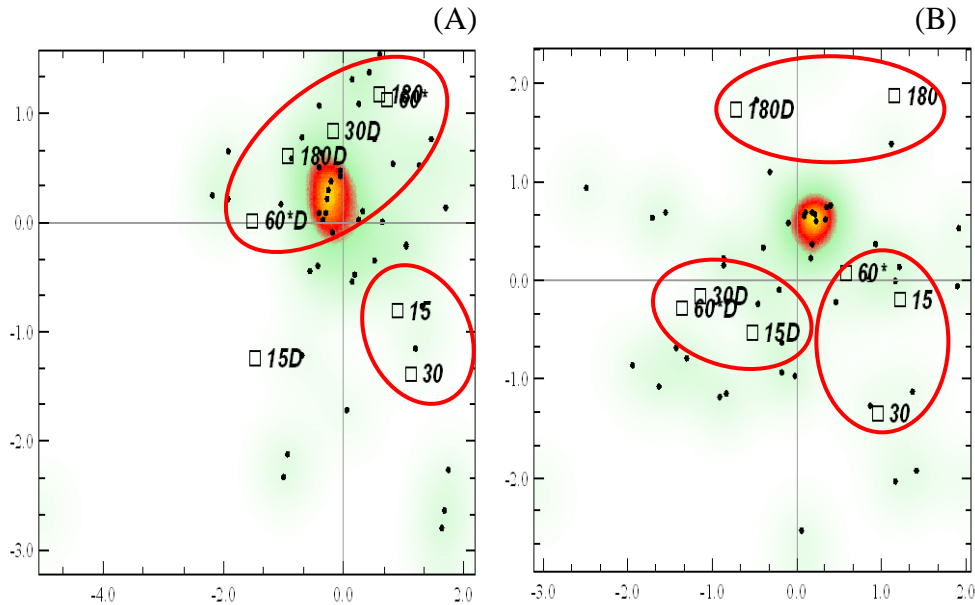


(2)



Obr. 18: Teplotní mapa proteomu rostlin kultivovaných na standardní (1) a na nízké (2) intenzitě světla. U každého profilu je uvedeno označení časových variant (v pořadí neaktivované a aktivované rostliny) a AGI číslo identifikovaného proteinu (viz Tabulka 2). Profily proteinů v jednotlivých časových variantách jsou vztaženy k nultému bodu kontrolních a aktivovaných rostlin. Označením N/A jsou uvedeny proteinové spoty, které se nepodařilo identifikovat v následující MS analýze.

Z teplotních map byly pomocí téhož programu vygenerovány průměrné profily pro jednotlivé intenzity světla a pro rostliny se standardní a změněnou hladinou cytokininů (Příloha 4). Nejvíce zastoupeny byly profily, kde abundance proteinu slabě vzrůstala v jednotlivých aplikacích teplotního stresu. Dále byly hojně zastoupeny profily s více či méně výraznou střídavou tendencí a profily s pozdní odpovědí.



**Obr. 19: Korespondenční analýza.** Analýza určuje podobnost mezi jednotlivými variantami na standardní intenzitě světla (A) a na nízké intenzitě světla (B). Na standardní intenzitě světla je patrná podobnost mezi krátkodobou odpovědí kontrolních rostlin a pak dlouhodobou odpovědí u kontrolních i aktivovaných rostlin. Na nízké intenzitě světla se odlišila krátkodobá odpověď neaktivovaných a aktivovaných rostlin a dlouhodobá odpověď rostlin.

Efekt teplotního stresu, snížené hladiny cytokininů a světla byl dále zkoumán pomocí korespondenční analýzy (Obr. 19). Ukázalo se, že v rostlinách se standardní hladinou endogenních cytokininů je odpověď proteomu na teplotní stres podobná bez ohledu na použitou intenzitu světla. Krátkodobé působení teplotního stresu je podobné pro působení stresu po dobu 15 i 30 min. Dlouhodobé působení teplotního stresu (180 min) se podobá pokusu zamýšlejícímu demonstrovat zotavení po 60 min teplotního stresu. Z analýzy je zřejmé, že velké množství proteinů výrazně změnilo abundanci až po dlouhodobém působení teplotního šoku.

Manipulace s hladinou endogenních cytokininů se neprojevuje při působení dlouhodobého stresu (180 min.). Rozdíl se však projevil ve stresu krátkodobém, kdy se od sebe odlišovaly varianty na obou intenzitách světla. Zatímco na standardní intenzitě světla se výrazně odlišovalo jen krátkodobé působení teplotního šoku (15 min),

střednědobé (30 min) i dlouhodobé (180 min.) působení se podobalo s pokusem o aklimatizaci (60 min). Na nízké intenzitě světla se však krátkodobé a střednědobé působení přiblížilo svým profilem pokusu o zotavení z teplotního stresu. Zde je tedy patrný výrazný efekt intenzity světla, což je pravděpodobně v souvislosti s propojením signálních drah pro cytokininy a světlo (Werner a Schmülling, 2009).

### **4.3 Identifikace signifikantně regulovaných proteinů pomocí MS**

Signifikantně regulované proteinové spoty byly izolovány a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie jak je uvedeno v kapitole Materiál a metodika. Z 55 izolovaných proteinových spotů bylo identifikováno celkem 52 spotů, z nichž bylo identifikováno 39 unikátních proteinů, z toho 35 enzymů. 5 proteinových spotů je identifikováno jako směs. A dalších 6 proteinů se vyskytovalo několikrát, pravděpodobně tedy v různých proteoformách. Dalších 11 proteinů bylo do studie doplněno na základě porovnání z přecházejících studií Černý et al. 2013. Přehled všech regulovaných proteinů je uveden v Tabulce č. 2.

Na standardní intenzitě světla bylo nalezeno 32 proteinů (5 proteinových spotů obsahovalo více jak jeden protein, jeden proteinový spot nebyl identifikován). Na nízké intenzitě světla bylo ze 40 proteinových spotů identifikováno 33 proteinů (1 proteinový spot obsahoval 2 proteiny, 3 proteinové spoty se nepodařilo identifikovat). Přestože byly pro analýzu spoty vždy vyřezány z minimálně 10 gelů, zřejmě nebylo množství proteinů dostatečné pro citlivost MS. Z 10 proteinových spotů regulovaných na obou intenzitách bylo identifikováno 11 proteinů, jedna proteinová skvrna totiž byla směsí dvou podjednotek stejného enzymu. Několik proteinů bylo nalezeno ve více než jedné proteinové skvrně (Tabulka 2). Jeden protein byl nalezen ve 4 proteinových spotech s rozdílnými MW/pI, přičemž 3 tyto proteinové spoty byly regulovány pouze na nízké intenzitě světla. Další 2 proteiny byly obsaženy duplicitně ve 4 proteinových spotech pouze na nízké intenzitě světla a jeden protein ve dvou spotech pouze na nízké intenzitě světla. Vznik nových proteinového spotu téhož proteinů mohou způsobit post-translační modifikace proteinu, proteolýzu *in vivo* nebo degradaci proteinu *in vitro* (Bocian et al., 2011).

Tabulka č. 2: **Identifikované proteiny modulované teplotou a intenzitou světla**; *Tmavě červeně jsou vyznačeny proteiny regulované na obou světelných intenzitách, zelenou barvou proteiny regulované jen na standardní intenzitě světla a modrou ty nalezené pouze na nízké intenzitě světla.*

No.	AGI (TAIR)	Name (UniProt)	MW (theo/exp)	pI (theo/exp)	Score
1	AT2G26080.1	Glycine dehydrogenase [decarboxylating] 2, mitochondrial	113,7 / 105	6,2 / 5,8	880.3
2	AT2G05710.1	Aconitate hydratase 2, mitochondrial	108,1 / 100	6,8 / 6	1282.0
3	AT5G17920.1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	84,3 / 78	6,1 / 6,3	1884.1
4	AT1G12900.3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPA2, chloroplastic	37,6 / 37	8,8 / 7	784.0
	AT3G26650.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPA1, chloroplastic	42,5 / 37	8,8 / 7	774.5
5	AT4G28520.2	12S seed storage protein CRC	43,7 / 30	6,1 / 6,8	427.6
6	AT3G01500.1	Beta carbonic anhydrase 1, chloroplastic	29,5 / 25	5,4 / 6,6	715.8
7	AT3G60820.1	Proteasome subunit beta type-1	24,6 / 24,9	7,7 / 6,5	719.3
8	AT3G62030.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-3, chloroplastic	28,2 / 23	9,7 / 5,3	827.1
9	AT5G02500.1	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e (Heat shock 70kDa protein1)	71,3 / 70	4,9 / 5	1416.1
10	AT4G29060.1	Elongation factor Ts family protein	103,7 / 100	4,8 / 4,5	820.1
11	AT1G09340.1	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa b, chloroplastic	42,6 / 40	8,9 / 7	912.3
12	AT3G04120.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, cytosolic	36,9 / 35	6,7 / 6,9	620.8
13	AT1G04410.1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1	35,5 / 37	6,1 / 6,3	351.2
14	AT3G04120.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, cytosolic	36,9 / 40	6,7 / 6,3	473.9
15	AT1G04410.1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1	35,5 / 36	6,1 / 6,1	593.0
16	AT5G23540.1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	34,3 / 33	6,3 / 6,3	435.0
17	AT2G25280.1	Hypotetical protein   Extradiol_Dioxygenase_3B_like	32,6 / 32	6,4 / 6,4	229.4
18	AT3G57610.1	Adenylosuccinate synthetase, chloroplastic	52,9 / 50	6,8 / 6,3	826.5
19	AT5G17920.1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	84,3 / 80	6,1 / 6,3	1660.5
20	AT2G19900.1	NADP-dependent malic enzyme 1	64,2 / 65	6,3 / 6,6	510.4

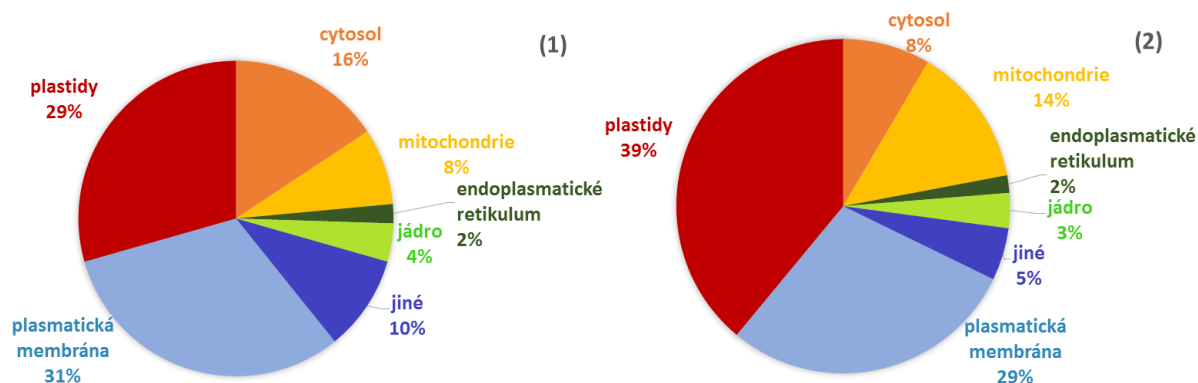
No.	AGI (TAIR)	Name (UniProt)	MW (theo/exp)	pI (theo/exp)	Score
21	AT3G09260.1	Beta-glucosidase 23	59,7 / 64	6,5 / 6,8	650.1
22	AT4G31990.1	Aspartate aminotransferase, chloroplastic	49,8 / 40	8,9 / 6,8	799.2
23	AT1G68010.1	Glycerate dehydrogenase HPR, peroxisomal	42,2 / 44	6,8 / 7	765.0
24	AT1G42970.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplastic	47,6 / 45	6,4 / 5,9	601.8
25	AT1G03880.1	12S seed storage protein CRU3	50,5 / 29	6,6 / 7	400.6
26	AT2G30860.1	Glutathione S-transferase F9	24,1 / 24,8	6,2 / 6,9	368.6
27	AT3G01500.1	Carbonic anhydrase, chloroplastic	29,5 / 26	5,4 / 6,3	709.8
28	AT3G01500.3	Carbonic anhydrase, chloroplastic	36,1 / 26	5,3 / 5,8	777.2
29	AT4G25100.1	Superoxide dismutase [Fe] 1, chloroplastic	23,8 / 24	6,1 / 3,1	381.5
30	AT4G23680.1	Putative major latex protein (AT4g23680/F9D16_150)	17,5 / 20	5,9 / 6	224.9
31	AT1G16470.1	Proteasome subunit alpha type-2-A	25,7 / 26	5,4 / 5,4	568.9
32	AT3G01500.1	Carbonic anhydrase, chloroplastic	29,5 / 29	5,4 / 5,4	624.0
33	AT5G14740.2	Carbonic anhydrase 2, chloroplastic	28,3 / 28	5,3 / 5,3	470.2
34	AT2G21330.2	Probable fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic	33,3 / 35	6,4 / 5,4	321.5
35	AT2G31390.1	Probable fructokinase-1	35,3 / 35	5,2 / 5,1	522.8
36	AT4G26970.1	Aconitate hydratase 3, mitochondrial	108,4 / 100	6,8 / 5,8	1132.0
37	AT2G39730.1	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	51,9 / 49	5,8 / 5	1846.0
38	ATCG00480.1	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	53,9 / 52	5,3 / 5,3	1595.3
39	AT5G04590.1	Sulfite reductase [ferredoxin], chloroplastic	71,9 / 70	9,2 / 7,6	468.0
40	AT4G37930.1	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	57,4 / 55	8,8 / 7,4	1024.1
41	AT1G77510.1	Protein disulfide isomerase-like 1-2	56,3 / 56	4,8 / 4,8	795.0
42	AT4G24280.1	Heat shock 70 kDa protein 6, chloroplastic	76,5 / 76	4,9 / 4,8	1028.2
43	AT3G60750.2	Transketolase-1, chloroplastic	79,8 / 75	6 / 5,5	1012.7
44	AT2G15620.1	Ferredoxin--nitrite reductase, chloroplastic	66 / 65	6 / 5,8	835.4
	AT5G17380.1	2-hydroxyacyl-CoA lyase	61,4 /	5,7 /	549.7
	AT4G05180.1	Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic	24,6 /	10,1 /	382.0
45	AT4G21280.1	Oxygen-evolving enhancer protein 3-1, chloroplastic	23,8 / 20	10 / 10	346.2
	AT3G26060.1	Peroxiredoxin Q, chloroplastic (1.11.1.15)	23,7 /	10,1 /	294.9

No.	AGI (TAIR)	Name (UniProt)	MW (theo/exp)	pI (theo/exp)	Score
46	AT3G15950.2	TS1-like protein1	80,7 / 100	4,5 / 4,3	952.5
47	AT3G09840.1	Cell division control protein 48 homolog A	89,3 / 90	5 / 5,1	1270.5
	AT1G55490.1	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic	63,8 /	6,2 /	1098.3
48	AT3G13470.1	Chaperonin 60 subunit beta 2, chloroplastic	63,3 /	5,5 /	1093.2
	AT3G23990.1	Chaperonin CPN60, mitochondrial	61,2 / 60	5,5 / 5,2	922.3
	AT3G53110.1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 38	55,3 /	5 /	797.0
49	ATCG00120.1	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	55,3 / 55	5 / 5,1	685.0
50	AT3G17240.1	Dihydrolipoyl dehydrogenase 2, mitochondrial	54 / 54	6,6 / 6,2	1205.6
51	AT2G44350.1	Citrate synthase 4, mitochondrial	52,6 / 50	6,4 / 6	1107.2
52	AT2G43910.1	Thiocyanate methyltransferase 1	25,3 /	4,6 /	420.1
	AT1G53850.1	Proteasome subunit alpha type-5-A	25,9 / 25	4,6 / 4	379.0
S01	At4g33010	Glycine dehydrogenase [decarboxylating] 2, mitochondrial	112,9 / 100	6,51 / 6,1	62
S03	At3g48990	AMP-dependent synthetase and ligase family protein	55,5 / 60	6,08 / 6,4	272
S04	At1g79550	Phosphoglycerate kinase	42 / 42	5,49 / 5,5	138
S05	At2g43750	Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplastic	41,6 / 35	8,14 / 5,6	357
S06	At2g38140	30S ribosomal protein S31, chloroplastic	13 / 20	10,17 / 3,5	58
S09	At2g16600	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP19-1	18,491 / 18	8,66 / 9	96
S18	At1g22530	Patellin-2	76,008 / 150	4,92 / 5	279
S26	At3g16410	Nitrile-specifier protein 4	67,604 / 50	4,99 / 5,4	215
S29	At2g13360	Serine--glyoxylate aminotransferase	44,2 / 40	7,69 / 8	626
S30	At3g04120	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	36,914 / 37	6,62 / 6,9	417
S31	At3g01480	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic	47,981 / 37	5,06 / 4,5	389
S35	At3g01480	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic	48 / 20	5,06 / 6,9	613



## 4.4 Lokalizace regulovaných proteinů

Další částí analýzy bylo dohledání informací o lokalizaci proteinů u všech aplikací teplotního stresu v kontrolních rostlinách i v rostlinách se sníženou hladinou cytokininů v podmínkách standardní a nízké intenzity světla. (Obr. 20)

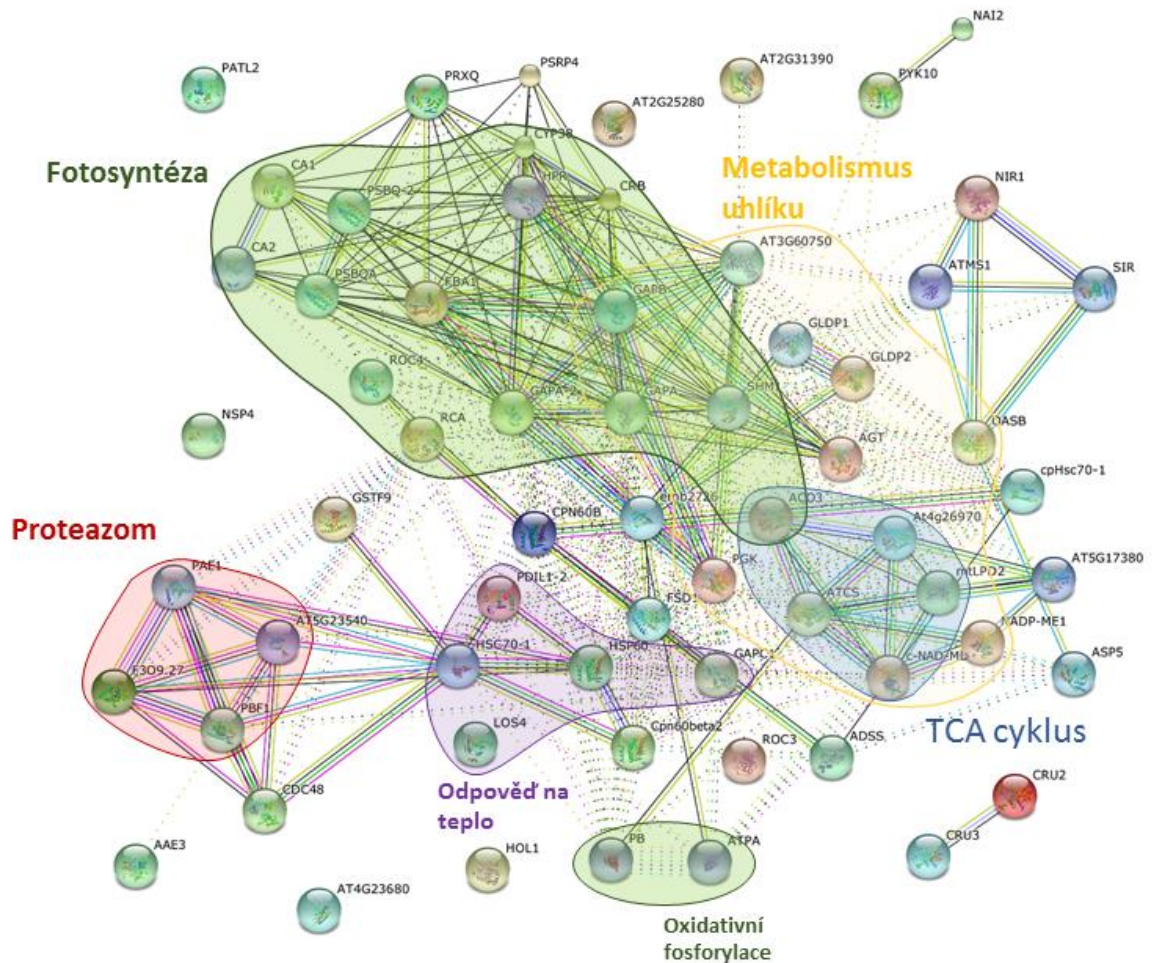


Obr. 20: **Lokalizace identifikovaných proteinů.** Na grafech je znázorněno procentuální zastoupení proteinů u rostlin kultivovaných na standardní intenzitě světla (1) a na nízké intenzitě světla (2).

Více jak polovina regulovaných proteinů má určenou lokalizaci v plasmatické membráně a v plastidech. Můžeme tedy předpokládat, že hlavní odpověď na zvýšenou teplotu se odehrává právě tady. Na nízké intenzitě světla byl dokonce pozorován zvýšený počet proteinů lokalizovaných v plastidech. Téměř u všech proteinů lokalizovaných v plastidech došlo při snížení hladiny endogenních cytokininů ke změně expresního profilu oproti standardním rostlinám, což napovídá, že cytokininy mají vliv na proteiny v plastidech (Cortleven a Schmölling, 2015).

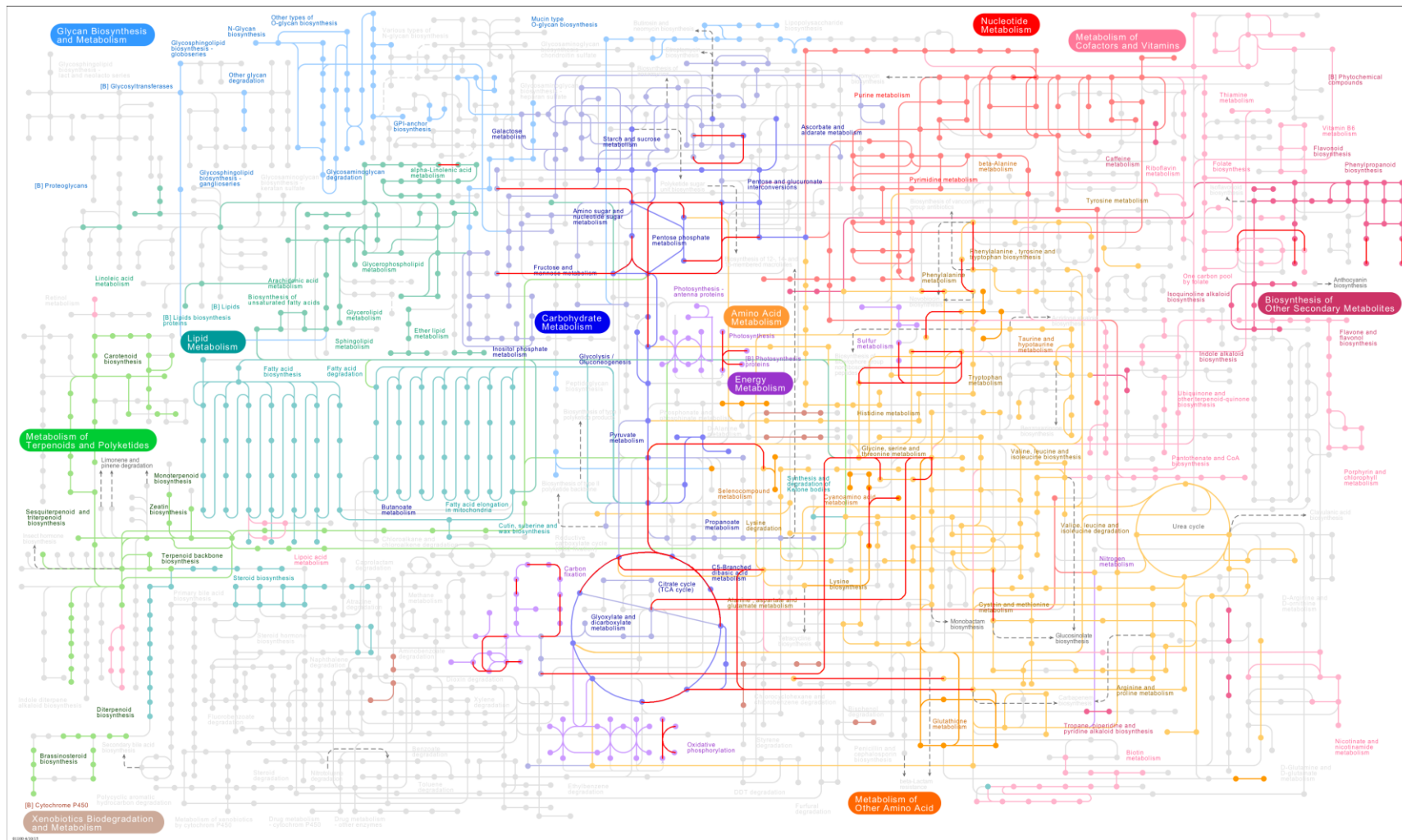
## 4.5 Funkce lokalizovaných proteinů

Informace o funkci identifikovaných proteinů byla dohledána z databází Uniprot, TAIR a portálu iHOP byla sumarizována v tabulce v Příloze 2. Pro získání protein-proteinových interakcí byl využit program String 9.1. Pomocí funkce „Enrichment“ zde byly dohledány a následně vizualizovány některé významné skupiny proteinů podle Gene Ontology termínů a Kegg metabolických drah a byly zobrazeny na Obr. 20. Pro zařazení identifikovaných enzymů do metabolismu Arabidopsis bylo využito nástroje Kegg Pathway (Obr. 21).



Obr. 21: Schematické znázornění protein-proteinových interakcí. Mapa protein-proteinových interakcí vygenerovaná programem String 9.1 v módu „Evidence view“. Seznam a charakteristika zkratk zobrazených proteinů je uveden v Příloze 5.

Většina proteinů byla propojená ve vzájemných interakcích a pomocí GO kategorií (Gene Ontology) bylo zjištěno, že většina patřila do pochodů primárního metabolismu rostliny. Jednou skupinou proteinů byly proteiny zapojené do procesů fotosyntézy či oxidační fosforylace. Další skupina byla spojena fixací uhlíku a jeho metabolismem s několika enzymy Krebsova cyklu. Bylo též nalezeno několik proteinů již dříve objevených v teplotní odpovědi a proteiny, jež jsou součástí proteazomu.

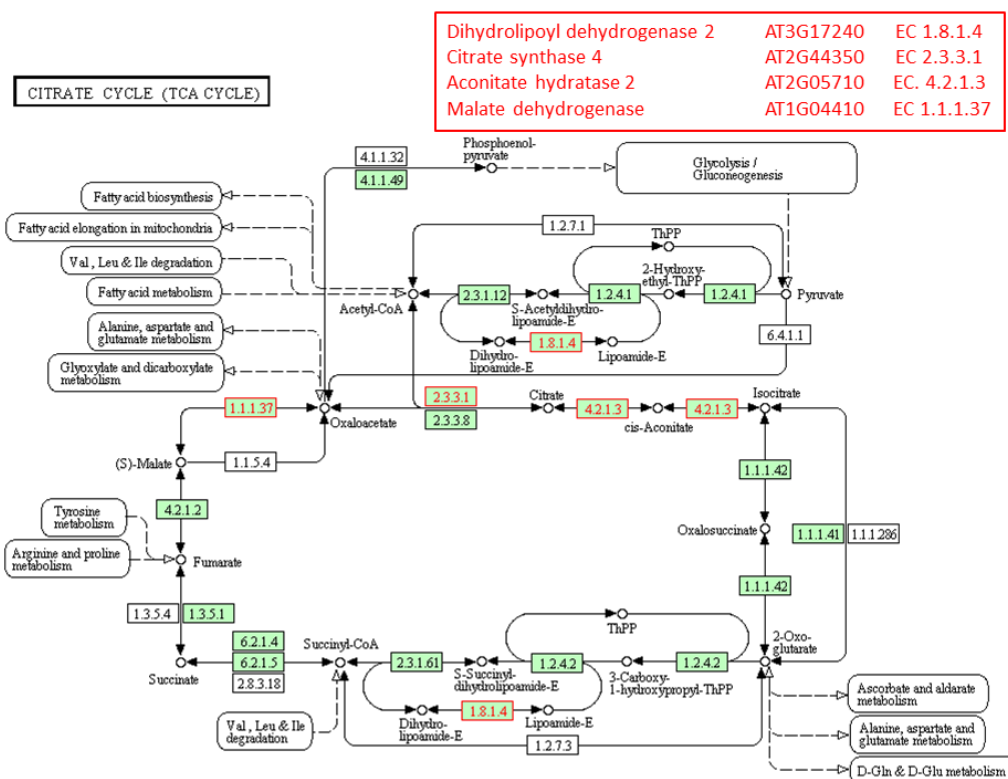


Obr. 22: Zvýraznění drah regulovaných identifikovanými proteiny a jejich zapojení do metabolismu Arabidopsis; Červenou barvou jsou zvýrazněny metabolické dráhy, do nichž jsou zapojeny enzymy z identifikovaných proteinů.

## 4.6 Vybrané regulované proteiny primárního metabolismu

Jedním z proteinů regulovaných na obou světelných intenzitách, které měli na nízké intenzitě světla opačnou regulaci než na intenzitě normální, byla mitochondriální akonitát hydratáza 2 (ACO2; AT2G05710, 2), která katalyzuje isomerizaci citrátu na isocitrát přes cis-akonitázový intermediát. To naznačuje, že se podílí na Krebsově cyklu a dalších drahách primárního metabolismu. Ovlivňuje také transkripční hladinu superoxid dismutázy a může tak hrát roli v oxidačním stresu. Pravděpodobně se vyskytuje v mitochondriích a cytosolu. U rostlin kultivovaných na nízké intenzitě byl jejich obsah snižován, zatímco na intenzitě standardní byl protein nadregulován. Snížení hladiny cytokininů nemělo na hladinu ACO2 vliv.

Mezi regulovanými proteiny byly i další zapojené do citrátového cyklu nebo s ním související (Obr. 23). Patří mezi ně např. mitochondriální citrát syntáza 4 (AT2G44350, 51), která je prvním enzymem Krebsova cyklu katalyzujícím kondenzaci acetylkoenzymu A a oxalacetátu, cytosolická malát dehydrogenáza (AT1G04410, 13 a 15) či dihydrolipoyl dehydrogenáza 2 (AT3G17240, 50).



Obr. 23: Citrátový (TCA) cyklus s vyznačenými regulovanými proteiny

Společně s citrátovým cyklem bylo regulováno množství proteinů spojených s fotosyntézou, fixací a metabolismem uhlíku. Zajímavě byla regulována např. podjednotka 2 chloroplastové glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy A (GAPA2; AT1G12900, 4), která je zapojena do Calvin-Bensonova cyklu a katalyzuje redukci 1,3-difosfoglycerátu pomocí NADPH aktivity. Na nízké intenzitě světla byla GAPA2 podregulována, ovšem po snížení hladiny cytokininů došlo k její pozitivní regulaci. Oproti tomu na nízké intenzitě světla hladina proteinu rostla ve všech aplikacích. Dalším enzymem pravděpodobně spojeným s Calcinovým cyklem je chloroplastická transketoláza 1 (AT3G60750, 43), která zřejmě katalyzuje reverzní transfer dvouuhlíkaté ketolové skupiny na glycerinaldehyd-3-fosfát a může se chovat jako senzor zahrnutý v adaptačním procesu. Dále byly mezi regulovanými proteiny podjednotky A (ATCG00120, 49) a podjednotka B ATP syntázy (ATCG00480, 38), což je enzym zapojený do oxidační fosforylace a podílí se na tvorbě ATP z ADP a fosfátu. Množství proteinů zapojených v primárním metabolismu rostliny a jeho pravděpodobné ovlivnění teplotním šokem bylo popsáno též ve studii Černý et al., 2014.

#### **4.7 Vybrané regulované proteiny zapojeny do jiných pochodů**

Další skupinou proteinů bylo několik molekulárních chaperonů s nejvýrazněji modulovaným zástupcem Pravděpodobným mediátorem transkripční podjednotky 37c RNA Polymerázy II (AT5G02500, 9), který je součástí chaperonové rodiny HSP70. Je součástí mediátorového komplexu, který je zahrnut v aktivaci téměř všech RNA Pol II genů. Ve spolupráci s dalšími chaperony Hsp70 stabilizuje proteiny proti agregaci, zprostředkovává skládání nových proteinů a je pravděpodobně zahrnutý v odpovědi na stres. Hladina tohoto proteinu na standardní intenzitě světla klesala po dlouhodobém vystavení teplotnímu stresu, k jeho nadregulaci došlo pouze po snížení hladiny cytokininů v 15 min teplotního stresu, poté začal jeho obsah opět klesat. Oproti tomu na nízké intenzitě světla byl nadregulován ve všech aplikacích. Do stejné rodiny chaperonů patřil i další regulovaný protein chloroplastický Heat shock 70kDa protein 6 (AT4G24280, 42). Ten se spolupodílí na cílení prekurzorů do chloroplastů a spolu s HSP70-7 se podílí na termotoleranci v klíčících semenech. V experimentu byl regulován pouze na standardní intenzitě světla a po snížení hladiny endogenních cytokininů došlo k jeho nad-expresi oproti neaktivovaným rostlinám, kde jeho hladina klesala. Role HSP jako chaperonů v odpovědi na abiotický stres je klíčová, protože obnovují normální proteinové konformace a tím buněčnou homeostázu a také mohou

interagovat s mnoha stresovými signálními mechanismy (Wang et al., 2004). Dalším proteinem s chaperonovou funkcí je TSA1-like protein (NAI2, AT3G15950, 46), který je odpovědný za formaci ER tělíska (tzv. „ER body“), což je od endoplasmatického retikula derivovaný útvar, který je obklopen ribozomy. Jeho funkce zatím nebyly objasněny, ale zdá se, že jeho činnost je spojena s aktivitou  $\beta$ -glukosidázy, která se může podílet na produkci přírodních pesticidů, aktivaci glykosylovaných fytohormonů nebo na degradaci buněčné stěny (Matsushima et al., 2003).

Byla nalezena také skupina proteinů zastupujících různé podjednotky proteazomu, multikatalytického proteinázového komplexu, který je charakterizován schopností vázat peptidy s Arg, Phe, Tyr, Leu, a Glu sousedící s odštěpovanou skupinou za neutrálního nebo slabě bazického pH a má ATP dependentní proteolytickou aktivitu. Šlo o podjednotku proteazomu beta typu 1 (AT3G60820, 7), homolog 26S proteazomální ne-ATPázové regulační podjednotky 14 (AT5G23540, 16), podjednotku proteazomu typu 2-A (AT1G16470, 31) a podjednotku proteazomu alfa typu 5-A (AT1G53850, 52). Rostliny obsahují směs 26S a 20S proteazomů, které zprostředkovávají na ubiquitinu závislou či nezávislou proteolýzu teplotním šokem či jinými stresy poškozených proteinů. Snížená biogeneze 26S proteazomu způsobuje u rostlin *Arabidopsis* hypersenzitivitu na teplotní šok a zároveň vede ke zvýšené biogenezi proteasomu 20S, který zvyšuje kapacitu buňky degradovat oxidované proteiny, což ve výsledku vede ke zvýšené odolnosti k oxidačnímu stresu. Poměr aktivit 26S a 20S proteazomů tedy může hrát roli ve vývoji a stresových reakcích rostlin (Kurepa et al., 2009).

## 5 ZÁVĚR

Z environmentálních faktorů působících na rostlinu má velký význam teplota. Přestože do současné doby nebyl nalezen žádný přímý receptor teploty, je popsáno několik mechanismů, jakými je teplota rostlinami vnímána. Navíc množství studií propojení vnímání teploty a světla. Možností objasnění této problematiky za využití proteomických metod se zabývala i tato diplomová práce. Experiment měl za cíl sledování krátkodobé a dlouhodobé odpovědi proteomu rostlin na působení zvýšené teploty a vlivu snížené hladiny endogenních cytokininů na vnímání teplotního stresu. Z celkově 67 nalezených proteinových spotů bylo analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie identifikováno 63 proteinů, z nichž několik bylo přítomno ve více proteoformách nebo s pravděpodobnými post-translačními modifikacemi.

Zvýšená teplota se ukázala jako významný stimul pro signifikantní změnu profilu u velkého množství proteinů přítomných ve všech typech organel rostlinné buňky. Více jak polovina proteinů má predikovanou lokalizaci v plasmatické membráně a plastidech, což potvrzuje hypotézu vnímání teplotního stimulu právě v těchto místech. Cytokiny pak měly velký vliv na expresní profily regulovaných proteinů, proto lze očekávat, že hrají velkou roli při vnímání teplotního stresu.

Velké množství proteinů regulovaných v odpovědi na teplotní stres bylo součástí primárního metabolismu rostliny. Je tedy zřejmé, že změny v toku metabolitů jednotlivými drahami jsou důležité pro mobilizaci energetických zdrojů pro syntézu obranných látek a zapojení obranných mechanismů rostliny vůči stresu. Poznání těchto změn a samotného mechanismu odpovědi na stres je důležité pro hodnocení a výběr zemědělsky využívaných rostlin a jednotlivých kultivarů pro pěstování za stresových podmínek.

Údaje získané v diplomové práci mohou sloužit jako výchozí bod pro další výzkum s možnými navazujícími kroky jako je stanovení aktivity nalezených enzymů, stanovení metabolitů pro detailnější sledování změn v primárním metabolismu, sledování dynamiky transkriptů v brzkých odpovědích na teplotní stres či konečné použití mutantních a transgenních rostlin pro další pochopení molekulárních mechanismů odpovědi na teplotu a možné role cytokininů a světla v těchto procesech.

Tato práce vznikla s podporou projektu CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu regionálního rozvoje (ERDF).

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aebersold, R. a M. Mann (2003): *Mass spectrometry-based proteomics*; Nature, 422/6928: 198-207

Ahmed, H. (2005): *Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization*; Boca Raton, CRC Press, 387 str., ISBN 08-493-2034-8.

Argueso C.T., F.J. Ferreira, J.J. Kieber, N. Imin a P.A. Haynes (2009): *Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways*; The Plant Cell, 32: 1147-1160

Argueso, C.T., T. Raines and J. Kieber (2010): *Cytokinin signaling and transcriptional network*; Current Opinion in Plant Biology 13: 533-539

Balogi, Z., Z. Török, G. Balogh, K. Jósavay, N. Shigapova, E. Vierling, L. Vigh a I. Horváth (2005): *"Heat shock lipid" in cyanobacteria during heat/light-acclimation*; Archives of Biochemistry and Biophysics, 436: 346-354

Bocian, A., A. Kosmala, M. Rapacz, B. Jurczyk, Ł. Marczak a Z. Zwierzykowski (2011): *Differences in leaf proteome response to cold acclimation between Lolium perenne plants with distinct levels of frost tolerance*; Journal of Plant Physiology, 168: 1271-1279

Bruker Daltonik GmbH (2009): *Training Documents amaZon speed ETD*, 1. vyd. amaZon Series, Bruker Daltonics, Německo, 116 str.

Catala, R., J. Medina, J. Salinas, E.-M. Josse, Ch. Fankhauser a K.J. Halliday (2011): *Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis*; Proceedings of the National Academy of Sciences, 108 (39): 16475-16480

Cortleven, A. a T. Schmölling (2015): *Regulation of chloroplast development and function by cytokinin*; Journal of Experimental Botany - Advance Access, publikováno online na: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/early/2015/04/03/jxb.erv132.abstract>

Černý M., F. Dyčka, J. Bobáľová a B. Brzobohatý (2011): *Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of Arabidopsis thaliana identified by proteome and phosphoproteome profiling*, Journal of Experimental Botany, 62:921-937

Černý, M., A. Kuklová, W. Hoehenwarter, L. Fagner, O. Novák, G. Rotková, P. L. Jedelský, K. Žáková, M. Šmehilová, M. Strnad, W. Weckwerth a B. Brzobohatý (2013): *Proteome and metabolome profiling of cytokinin action in Arabidopsis identifying both distinct and similar responses to cytokinin down- and up-regulation*; Journal of Experimental Botany, 64: 4193-4206

Černý, M., P. L. Jedelský, J. Novák, A. Schlosser a B. Brzobohatý (2014): *Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature shocks in Arabidopsis*; Plant, Cell and Enviroment, 37: 1641-1655



Damerval, C., D. De Vienne, M. Zivy a H. Thiellement (1986): *Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins*; Electrophoresis, 7: 52-54

Duong-Ly, K.C. a S.B. Gabelli (2014): *Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation*; Methods in Enzymology, 541: 85-94

Duque A.S., A. Martinho de Almeida, A. Bernardes da Silva, J. Marques da Silva, A.P. Farinha, D. Santos, P. Fevereiro and S. de Sousa Araújo (2013): *Abiotic Stress Responses in Plants: Unraveling the Complexity of Genes and Networks to Survive*, 49-101, In: Dr. Kourosch Vahdati (Ed.), Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture, InTech, 418 s., ISBN: 978-953-51-1024-8, dostupné na: <http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-plant-responses-and-applications-in-agriculture>

Ferreira, F. J. a J. J. Kieber (2005): *Cytokinin signaling*; Current Opinion in Plant Biology, 8: 518-525

Finka, A., R.U.H. Mattoo a P. Goloubinoff (2011): *Meta-analysis of heat- and chemically upregulated chaperone genes in plant and human cells*; Cell Stress and Chaperones, 16: 15-31

Foreman, J., H. Johansson, P. Hornitschek, E.-M. Josse, Ch. Fankhauser a K.J. Halliday (2011): *Light receptor action is critical for maintaining plant biomass at warm ambient temperatures*; The Plant Journal, 65(3): 441-452

Franklin, K. A., G. Toledo-Ortiz, D. E. Pyott a K. J. Halliday (2014): *Interaction of light and temperature signalling*; Journal of Experimental Botany, 65(11): 2859-2871

Frébort, I., M. Kowalska, T. Hluska, J. Frébortová a P. Galuszka (2011): *Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation*; Journal of Experimental Botany, 62: 2431-2452

Galuszka, P., H. Popelková, T. Werner, J. Frébortová, H. Pospíšilová, V. Mik, I. Köllmer, T. Schmülling a I. Frébort (2007): *Biochemical Characterization of Cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from Arabidopsis thaliana Expressed in Nicotiana tabacum L.*; Journal of Plant Growth Regulation, 26: 255-267

Glatz, A. (1999): *The Synechocystis model of stress: from molecular chaperones to membranes*; Plant Physiology and Biochemistry, 37: 1-12

Gong, M. (1998): *Heat-Shock-Induced Changes in Intracellular Ca<sup>2+</sup> Level in Tobacco Seedlings in Relation to Thermotolerance*; Plant Physiology. 116: 429-437

Heschel, M. S., J. Selby, C. Buttler, G.C. Whitelam, R.A. Sharrock a K. Donohue (2007): *A new role for phytochromes in temperature-dependent germination*; New Phytologist, 174(4): 735-741

Hirose, N., K. Takei, T. Kuhora, T. Kamada-Nobusada, H. Hayashi a H. Sakakibara (2008): *Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation*; Journal of Experimental Botany, 59: 75-83

Hong-Tao, L. (2005): *Ca<sup>2+</sup> and AtCaM3 are involved in the expression of heat shock protein gene in Arabidopsis*; Plant, Cell and Environment, 28: 1276-1284

Horváth, I. (1998): *Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in Synechocystis PCC 6803: Identification of hsp17 as a „fluidity gene“*; Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 95: 3513–3518

Horváth, I. (2012): *Heat shock response in photosynthetic organisms: Membrane and lipid connections*; Progress in Lipid Research, 51: 208-220

Chinnusamy, V., K. Schumaker a J.-K. Zhu (2003): *Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants*; Journal of Experimental Botany, 55(395): 225-236

Jenks, M.A. a P.M. Hasegawa (2005): *Plant abiotic stress*; Oxford, UK; Ames, Iowa: Blackwell Pub., 270 stran, ISBN 14-051-2238-2

Kaboord, B. a M. Perr (2008): *Isolation of Proteins and Protein Complexes by Immunoprecipitation*; Methods in Molecular Biology, 424: 349-364

Karas, M., D. Bachmann, U. Bahr a F. Hillenkamp (1987): *Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds*; International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 78: 53-68

Kaur, N. a A.K. Gupta (2005): *Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants*; Current Science, 88 (10): 1771-1780

Kavoosi, G. a S.K. Ardestani (2012): *Gel Electrophoresis of Protein - From Basic Science to Practical Approach*; Gel Electrophoresis - Principles and Basics, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), InTech, ISBN: 978-953-51-0458-2

Katari MS, S.D. Nowicki, F.F. Aceituno, D. Nero, J. Kelfer, L.P. Thompson, J.M. Cabello, R.S. Davidson, A.P. Goldberg, D.E. Shasha, G.M. Coruzzi a R.A. Gutierrez (2010): *VirtualPlant: A software platform to support Systems Biology research*; Plant Physiology, 152(2): 500-515

Knight, H. a M.R. Knight (2001): *Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk*; Trends in Plant Science, 6: 262–267

Königshofer, H., H.-W. Tromballa a H.-G. Löppert (2008): *Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production*; Plant, Cell, 31: 1771-1780

Kotak, S. (2007): *Complexity of the heat stress response in plants*; Current Opinion in Plant Biology, 10: 310-316

Kudo, T., T. Kiba a H. Sakakibara (2010): *Metabolism and Long-distance Translocation of cytokinins*; Journal of Integrative Plant Biology, 52: 53-60

- Kumar, S.V. a P.A. Wigge (2010): *H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis*; Cell, 140: 136-147
- Kurepa, J., S. Wang, Y. Li, a J. Smalle (2009): *Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance*; Plant Signaling & Behavior, 4: 924-927
- Lata, Ch., A. Yadav a M. Prasad (2011): *Role of Plant Transcription Factors in Abiotic Stress Tolerance*, In: Prof. Arun Shanker (Ed.), *Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*, Intech, str. 269-296, ISBN: 978-953-307-672-0, dostupné na: <http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-response-in-plants-physiological-biochemical-and-genetic-perspectives>
- Lichtenthaler H.K. (1996): *Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants*; Journal of Plant Physiology, 148: 4-14
- Lobell, D.B, W. Schlenker a J. Costa-Roberts (2011): *Climate Trends and Global Crop Production Since 1980*; Science, Vol. 333; 6042: 616-620
- Lochmanová, G., Z. Zdráhal, H. Konečná, Š. Koukalová, J. Malbeck, P. Souček, M. Válková, N. S. Kiran a B. Brzobohatý (2008): *Cytokinin-induced photomorphogenesis in dark-grown Arabidopsis: a proteomic analysis*; Journal of Experimental Botany, 59: 3705-3719
- Matsushima, R. Y. Hayashi, K. Yamada, T. Shimada, M. Nishimura a I. Hara-Nishimura (2003): *The ER Body, a Novel Endoplasmic Reticulum-Derived Structure in Arabidopsis*; Plant and Cell Physiology, 44: 661-666
- Miller, C.O., F. Skoog, M.H. von Saltza, F.M. Strong (1955): *Kinetin, a cell division factor drom deoxyribonucleic acid*; Journal of American Chemical Society 78: 2662-2663
- Miller, C.O., F. Skoog, F.S. Okomura, M.H. von Salta, F.M. Strong (1956): *Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division*; Journal of the American Chemical Society, 78: 1345-1956
- Mishkind, M., J.E.M. Vermeer, E. Darwish a T. Munnik (2009): *Heat stress activates phospholipase D and triggers PIP2 accumulation at the plasma membrane and nukleus*; The Plant Journal, 60: 10-21
- Mittler, R. A. Finka a P. Goloubinoff (2012): *How do plants feel the heat?*; Trends in Biochemical Sciences, 37: 118-125
- Oeljeklaus, S., H. E. Meyer a B. Warscheid (2009): *Advancements in plant proteomics using quantitative mass spectrometry*; Journal of Proteomics, 72: 545-554
- Osakabe, Y., K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki a L.-S.P. Tran (2013): *Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress*; Journal of Experimental Botany, 64: 445-458

- Penfield, S. (2008): *Temperature perception and signal transduction in plants*; New Phytologist, 179: 615–628
- Perilli, S., L.Moubayidin a S. Sabatini (2010): *The molecular basis of cytokinin function*; Current Opinion in Plant Biology 13: 21-25
- Pham, J., J. LIU, M.H. Bennett, J.W. Mansfield a R. Desikan (2012): *Arabidopsis histidine kinase 5 regulates salt sensitivity and resistance against bacterial and fungal infection*; New Phytologist, 194: 168-180
- Reddy, A.S.N., G.S. Ali, H. Celesnik a I.S. Day (2011): *Coping with Stresses: Roles of Calcium and Calcium/Calmodulin-Regulated Gene Expression*; The Plant Cell, 23: 2010-2032
- Riefler, M., O. Novák, M. Strnad a T. Schmülling (2006): *Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination, Root Development, and Cytokinin Metabolism*; The Plant Cell, 18: 40-54
- Rizhsky, L. (2004): *When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress*; Plant Physiology, 134: 1683-1696
- Ruelland, E. a A. Zachowski (2010): *How plants sense temperature*; Environmental and Experimental Botany, 69: 225-232
- Saidi, Y. (2009): *The Heat Shock Response in Moss Plants Is Regulated by Specific Calcium-Permeable Channels in the Plasma Membrane*; The Plant Cell, 21: 2829-2843
- Saidy, Y. (2010) *Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca<sup>2+</sup>-dependent heat shock response*; Plant Signaling and Behaviour, 5: 1530-1533
- Sakakibara, H. (2006): *Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation*; Plant Biology, 57: 431-449
- Shanker A. and B. Venkateswarlu (2011): *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*, kapitoly publikovány pod licencií CC BY-NC-SA 3.0, InTech, 440 str., ISBN 978-953-307-394-1, dostupné na <http://www.intechopen.com/books/how-to-link/abiotic-stress-in-plants-mechanisms-and-adaptations>
- Sharkey, T. D. (2005): *Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene*; Plant, Cell & Environment, 28: 269–277
- Sweere, U., K. Eichenberg, J. Lohrmann, V. Mira-Rodado, I. Bäurle, J. Kudla, F. Nagy, E. Schafer a K. Harter (2001): *Interaction of the Response Regulator ARR4 with Phytochrome B in Modulating Red Light Signaling*; Science, 294: 1108-1111
- Šámalová, M., B. Brzobohatý, I. Moore (2005): *pOp6/LhGR: a stringently regulated and highly responsive dexamethasone-inducible gene expression system for tobacco*; The Plant Journal 41: 919–935

- Tran, L.-S.P., K. Shinozaki a K. Yamaguchi-Shinozaki (2010): *Role of cytokinin responsive two-component system in ABA and osmotic stress signalings*; Plant Signaling & Behavior, 5:148-150
- Velthuizen, H. van (2007): *Mapping biophysical factors that influence agricultural production and rural vulnerability*; Environment and natural resources series, no. 11; Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 84 stran., ISBN 92-510-5689-7
- Vigh, L. (1998): *Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?*; Trends in Biochemical Sciences, 23: 369-374
- Wang W., B. Vinocur a A. Altman (2003): *Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance*; Planta, 218:1-14
- Wang, W., B. Vinocur, O. Shoseyov a A. Altman (2004): *Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response*; Trends in Plant Science, 9: 244-252
- Werner, T. a T. Schmülling (2009): *Cytokinin action in plant development*; Current Opinion in Plant Biology 12: 527-538
- Wright, P.C., J. Noirel, S.-Y. OW a A. Fazeli (2012): *A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations*; Theriogenology, 77: 738-765
- Wulfetange, K., S. N. Lomin, G. A. Romanov, A. Stolz, A. Heyl a T. Schmülling (2011): *The Cytokinin Receptors of Arabidopsis thaliana are Locating Mainly to the Endoplasmic Reticulum*; Plant Physiology Preview; 156, 1808-1818
- Yan, W. a S.S. Chen (2005): *Mass spectrometry-based quantitative proteomic profilig*; Briefings in functional genomics and proteomics, 4:27-38
- Yamashita, M., J. B. Fenn, U. Bahr a F. Hillenkamp (1984): *Electrospray ion source, Another variation on the free-jet theme*; The Journal of Physical Chemistry, 88: 4451-4459
- Zhang, Y., B. R. Fonslow, B. Shan, M.-Ch. Baek a J.R. Yates (2013): *Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics*; Chemical Reviews, 113: 2343-2394

## 7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Proteomické strategie

Obr. 2: Schéma MALDI

Obr. 3: Schéma ESI

Obr. 4 Schéma principu fungování iontové pasti

Obr. 5: Zástupci isoprenoidních a aromatických cytokininů

Obr. 6: Současný model biosyntetické dráhy isoprenoidních cytokininů v *Arabidopsis*

Obr. 7: Buněčné rozmístění biosyntetických a degradačních enzymů cytokininů v *Arabidopsis thaliana*

Obr. 8: Biosyntéza a signalizace cytokininů je úzce propojena s environmentálními vstupy

Obr. 9: Mapa teplotních trendů v letech 1980-2008 pro vegetační období hlavních plodin

Obr. 10: Rostlinné reakce na abiotický stres

Obr. 11: Zjednodušený model signalizace v reakci rostlin na abiotický stres

Obr. 12: Schematický model vnímání teploty v rostlinách

Obr. 13: Schematické znázornění postupných událostí objevujících se v buňce po soustavné expozici mírnému nárůstu teploty

Obr. 14 Signální dráhy aktivované v reakci na tepelný stres u rostlin

Obr. 15: Schéma 2D analýzy proteomu rostlin *Arabidopsis thaliana* za stresu vysokou teplotou

Obr. 16: Účinky teplotního šoku na rostliny *Arabidopsis thaliana*

Obr. 17: Porovnání vlivu teploty a intenzity světla na proteom *A.thaliana*.

Obr. 18: Heat mapa proteomu rostlin kultivovaných na standardní a na nízké intenzitě světla

Obr. 19: Korespondenční analýza

Obr. 20 Lokalizace identifikovaných proteinů

Obr. 21: Schematické znázornění proteinových interakcí

Obr. 22: Zvýraznění drah regulovaných identifikovanými proteiny a jejich zapojení do metabolismu *Arabidopsis*

Obr. 23: Citrátový (TCA) cyklus s vyznačenými regulovanými proteiny

## 8 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Postup extrakce a solubilizace celkového proteomu Arabidopsis

Tabulka 2: Identifikované proteiny modulované teplotou a intenzitou světla

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ADP	adenosindifosfát
AHK	histidonová kináza
AHP	His-obsahující protein
AMP	adenosinmonofosfát
ARR	regulátor odpovědi
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosintrifosfát
BA	benzylalkohol
CaM	kalmodulin
CDPK	na vápníku závislá proteinová kináza
CKX	cytokininoxidáza/dehydrogenáza
CRF	C-opakující
cZ	cis-zeatin
DEX	dexamethason
DMAPP	dimethylallyl difosfát
DRE	element odpovědi na dehydrataci
DZ	dihydrozeatin
ESI	ionizace pomocí elektrospreje
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
His	histidin
HSF	transkripční faktory tepelného šoku
HSP	proteiny tepelného šoku
HSR	odpověď na tepelný šok
iP	N <sup>6</sup> – ( $\Delta^2$ -izopentyl)-adenin
IP <sub>3</sub>	myo-inositol-1,4,5-trisphosphate
IPT	isopentyladenin transferáza
IT	iontová past

LC	kapalinová chromatografie
LEA	akumulované v pozdní fázi embryogeneze
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MEP	methylethritolfosfátová cesta
MGlCDG	monoglukosyldiacylglycerolu
MVA	mevalonová cesta
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
PA	kyselina fosfatidová
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
phy	fytochrom
PIP <sub>2</sub>	fosfatidylinositol-(4,5)-bisfosfát
PIPK	fosfatidylinositol-fosfát kináza
PLD	fosfolipáza D
PTM	posttranslační modifikace
RLK	receptoru podobná kináza
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	sodium dodecyl sulfát
SOS	Salt-Overly-Sensitive
TF	transkripční faktor
TOF	„Time off flight“ analyzátor
tRNA	transferová ribonukleová kyseliny
tZ	trans-zeatin



## **10 SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha 1: Nastavení LC-MS/MS a parametry pro vyhledávání v Mascot

Příloha 2: Tabulka identifikovaných proteinů s jejich lokalizací a funkcí

Příloha 3: Tabulka proteinů doplněných ze studie Černý et al.

Příloha 4: Nejčastěji zastoupené expresní profily

Příloha 5: Výstup programu String

## 11 PŘÍLOHY

Příloha 1: Nastavení LC-MS/MS a parametry pro vyhledávání v Mascot

positive mode, AutoMSMS (2)	
CID “smart fragmentation“	
3 precursors	
active exclusion	
<b>MS scan mode</b>	
400-1400 m/z	Enhanced Resolution 8,100 m/z/sec
ICC 200000	50 ms max accu time
5 averages	
<b>MS/MS scan mode</b>	
Xtreme 52,000 m/z/sec	100 m/z – 2×precursor m/z
ICC 200000	100 ms max accu time
2 averages	
<b>Mascot 2.4.0 - TAIR 10 database search parameters:</b>	
Trypsin	max 2 missed cleavages
peptide tol. 0.3 Da	MS/MS tol. 0.3 Da
charge 2+, 3+, 4+;	monoisotopic
<sup>13</sup> C 1	
variable modifcatins – Acetyl (N-term), carbamidomethyl (C), pyro-Glu, oxidation (M), phosphorylation (S, T, Y)	

Příloha 2: Tabulka identifikovaných proteinů s jejich lokalizací a funkcí

No.	AGI	Name	Abbreviation (Uniprot)	EC	Localization (SUBA)		Function (TAIR, UniProt, Swiss-prot)
					MS/MS	GFP	
1	AT2G26080	Glycine dehydrogenase [decarboxylating] 2	GLDP2	1.4.4.2	mitochondrion	N/A	degradation of glycine
2	AT2G05710	Aconitate hydratase 2	ACO2	4.2.1.3	mitochondrion, plasma membrane, plastid	mitochondrion, plastid	isomerization citrate - isocitrate (TCA cycle)
3	AT5G17920	5- methyltetrahydropteroyltriglutamate- homocysteine methyltransferase	MS1	2.1.1.14	cytosol, plasma membrane, plastid, peroxizome	cytosol	Met biosynthesis
4	AT1G12900	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPA2, chloroplastic	GAPA2	1.2.1.13	plastid	N/A	carbohydrate biosynthesis; Calvin cycle.
	AT3G26650	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPA1, chloroplastic	GAPA1	1.2.1.13	plastid	N/A	carbohydrate biosynthesis; Calvin cycle.
5	AT4G28520	12S seed storage protein CRC	CRC (CRU3)	–	nucleus, plasma membrane	N/A	seed storage protein
6	AT3G01500 (.1)	Beta carbonic anhydrase 1, chloroplastic	BCA1	4.2.1.1	plastid (chloroplast)	plastid	reversible hydration of carbon dioxide
7	AT3G60820	Proteasome subunit beta type-1	PBF1	3.4.25.1	cytosol	N/A	proteolysis
8	AT3G62030	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-3, chloroplastic	CYP20-3	5.2.1.8	plastid (chloroplast stroma)	N/A	protein folding, regulation of Cys biosynthesis in response to stress
9	AT5G02500	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e (Heat shock 70kDa protein1)	HSC70-1	–	cytosol, plasma membrane	N/A	transcription regulation (mediator complex), stress response
10	AT4G29060	Elongation factor Ts family protein	–	–	plastid	N/A	protein biosynthesis
11	AT1G09340	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa b	CRB	–	plastid	plastid (chloroplast)	rRNA processing, carbohydrate metabolism, regulation of circadian system

No.	AGI	Name	Abbreviation (Uniprot)	EC	Localization (SUBA) MS/MS	GFP	Function (TAIR, UniProt)
12	AT3G04120	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, cytosolic	GAPC1	1.2.1.12	plasma membrane, mitochondrion	cytosol, cytoskeleton, mitochondrion	glycolysis, stress response
13	AT1G04410	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1		1.1.1.37	plasma membrane, plastid, nucleus, vacuole	N/A	TCA cycle
14	AT3G04120	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, cytosolic	GAPC1	1.2.1.12	cytosol, mitochondrion	cytosol, cytoskeleton, mitochondrion	glycolysis, stress response
15	AT1G04410	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1		1.1.1.37	plasma membrane, plastid, nucleus, vacuole	N/A	TCA cycle
16	AT5G23540	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 homolog		3.4.19.-	cytosol, plasma membrane	N/A	degradation of ubiquitinated proteins (Ubl conjugation pathway)
17	AT2G25280	Hypotetical protein   Extradiol_Dioxygenase_3B_like		–	plasma membrane	N/A	N/A
18	AT3G57610	Adenylosuccinate synthetase, chloroplastic	ADSS	6.3.4.4	plastid (chloroplast)		purine nucleotide biosynthesis, AMP biosynthesis
19	AT5G17920	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	MS1	2.1.1.14	cytosol, plasma membrane, plastid, peroxizome	cytosol, peroxizome	Met biosynthesis
20	AT2G19900	NADP-dependent malic enzyme 1	NADP-ME1	1.1.1.40	N/A	N/A	Malate metabolism, anaplerotic reactions
21	AT3G09260	Beta-glucosidase 23	BGLU-23	3.2.1.21	endoplasmic reticulum, vacuole, nucleus	endoplasmic reticulum	carbohydrate metabolic process, defence response, response to stress
22	AT4G31990	Aspartate aminotransferase, chloroplastic	ASP5	2.6.1.1	plastid	plastid (chloroplast)	metabolism of AMC and Krebs-cycle related organic acids, nitrogen metabolism, carbon and energy metabolism

No.	AGI	Name	Abbreviation (Uniprot)	EC	Localization (SUBA) MS/MS	GFP	Function (TAIR, UniProt)
23	AT1G68010	Glycerate dehydrogenase HPR, peroxisomal	HPR	1.1.1.29	peroxisome, plasma membrane, plastid	N/A	glycolate pathway, photorespiration
24	AT1G42970	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B (GAPB), chloroplastic	GAPB	1.2.1.13	chloroplast	N/A	carbohydrate biosynthesis, Calvin cycle
25	AT1G03880	12S seed storage protein CRB	CRB	–	nucleus, plasma membrane	N/A	seed storage protein
26	AT2G30860	Glutathione S-transferase F9	GSTF9	2.5.1.18	plasma membrane, plastid, cytosol	cytosol	detoxification, stress response
27	AT3G01500 (.1)	Beta carbonic anhydrase 1, chloroplastic	BCA1	4.2.1.1	plastid (chloroplast)	plastid (chloroplast)	reversible hydration of carbon dioxide
28	AT3G01500 (.3)	Beta carbonic anhydrase 1, chloroplastic	BCA1	4.2.1.1	plastid (chloroplast)	plastid (chloroplast)	reversible hydration of carbon dioxide
29	AT4G25100	Superoxide dismutase [Fe] 1, chloroplastic	FSD1	1.15.1.1	plastid, plasma membrane, mitochondrion	plastid (chloroplast)	destruction of superoxide radicals
30	AT4G23680	Putative major latex protein (AT4g23680/F9D16_150)		–	N/A	N/A	N/A
31	AT1G16470	Proteasome subunit alpha type-2-A	PAB1	3.4.25.1	cytosol, plasma membrane, nucleus	N/A	proteolysis
32	AT3G01500 (.1)	Beta carbonic anhydrase 1, chloroplastic	BCA1	4.2.1.1	plastid (chloroplast)	plastid (chloroplast)	reversible hydration of carbon dioxide
33	AT5G14740	Beta carbonic anhydrase 2, chloroplastic	CA2	4.2.1.1	plastid	N/A	reversible hydration of carbon dioxide
34	AT2G21330	Probable fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic	FBA1	4.1.2.13	plastid	plastid	carbohydrate degradation, glycolysis
35	AT2G31390	Probable fructokinase-1		2.7.1.4	cytosol, plasma membrane	N/A	glycan biosynthesis, starch biosynthesis, carbohydrate metabolism
36	AT4G26970	Aconitate hydratase 3, mitochondrial	ACO3	4.2.1.3	mitochondrion, plasma membrane	mitochondrion, plastid	carbohydrate metabolism, TCA cycle)

No.	AGI	Name	Abbreviation (Uniprot)	EC	Localization (SUBA) MS/MS	GFP	Function (TAIR, UniProt)
37	AT2G39730	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	RCA	–	plastid (chloroplast)	N/A	activation of RuBisCO
38	ATCG00480	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	ATPB	3.6.3.14	plastid, plasma membrane	N/A	ATP synthesis, ion transport
39	AT5G04590	Sulfite reductase [ferredoxin], chloroplastic	SIR	1.8.7.1	plastid (chloroplast)	N/A	sulfate reduction pathway, stress response
40	AT4G37930	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	SHM1	2.1.2.1	mitochondrion, plasma membrane, plastid	mitochondrion, cytosol	photorespiratory pathway, abiotic stress response
41	AT1G77510	Protein disulfide isomerase-like 1-2	PDIL1-2	5.3.4.1	endoplasmic reticulum, plasma membrane	N/A	protein folding catalyst
42	AT4G24280	Heat shock 70 kDa protein 6, chloroplastic	HSP70-6	–	plastid	N/A	stress responses, chaperone reactions, transport
43	AT3G60750	Transketolase-1, chloroplastic	TKL-1	2.2.1.1	plastid, plasma membrane	N/A	carbohydrate biosynthesis, Calvin cycle, stress response
44	AT2G15620	Ferredoxin--nitrite reductase	NIR1	1.7.7.1	plastid (chloroplast)	N/A	electron transport, nitrate assimilation
	AT5G17380	2-hydroxyacyl-CoA lyase	HACL	4.1.-.-	cytosol	N/A	carbon-carbon cleavage reaction catalyst
45	AT4G05180	Oxygen-evolving enhancer protein 3-2	PSBQ-2	–	plastid	N/A	photosynthesis
	AT4G21280	Oxygen-evolving enhancer protein 3-1	PSBQA	–	plastid	N/A	photosynthesis
	AT3G26060	Peroxioredoxin Q, chloroplastic	PRXQ	1.11.1.15	plastid	N/A	hydrogen peroxide reduction
46	AT3G15950	TS1-like protein1	NAI2	–	peroxisome, plasma membrane	N/A	N/A

No.	AGI	Name	Abbreviation (Uniprot)	EC	Localization (SUBA)		Function (TAIR, UniProt)
					MS/MS	GFP	
47	AT3G09840	Cell division control protein 48 homolog A	CDC48	–	cytosol, golgi, plasma membrane	cytosol, nucleus, plasma membrane	cell division, cell cycle, protein transport
48	AT1G55490	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic	CPN 60B	–	plastid, plasma membrane	N/A	protein folding
	AT3G13470	Chaperonin 60 subunit beta 2, chloroplastic	CPN60B2	–	mitochondrion, plastid, plasma membrane	N/A	protein folding
	AT3G23990	Chaperonin CPN60, mitochondrial	CPN60	–	mitochondrion, plasma membrane	mitochondrion	protein import, protein refolding, stress response
	AT3G53110	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 38	RH38	3.6.4.13	plasma membrane	N/A	mRNA transport, CBF/DREB regulation
49	ATCG00120	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	ATPA	3.6.3.14	plastid (chloroplast), plasma membrane	nucleus	ATP synthesis, ion transport
50	AT3G17240	Dihydrolipoyl dehydrogenase 2, mitochondrial	LPD2	1.8.1.4	mitochondrion	N/A	cell redox homeostasis, multienzyme 2-oxo-acid dehydrogenase complexes
51	AT2G44350	Citrate synthase 4, mitochondrial	CSY4	2.3.3.1	mitochondrion matrix	N/A	carbohydrate metabolism, TCA cycle
52	AT2G43910	Thiocyanate methyltransferase 1	HOL1	2.1.1.n4	plasma membrane	cytosol	glucosinolate metabolism, defense response
	AT1G53850	Proteasome subunit alpha type-5-A	PAE1	3.4.25.1	cytosol, plasma membrane	N/A	proteolysis

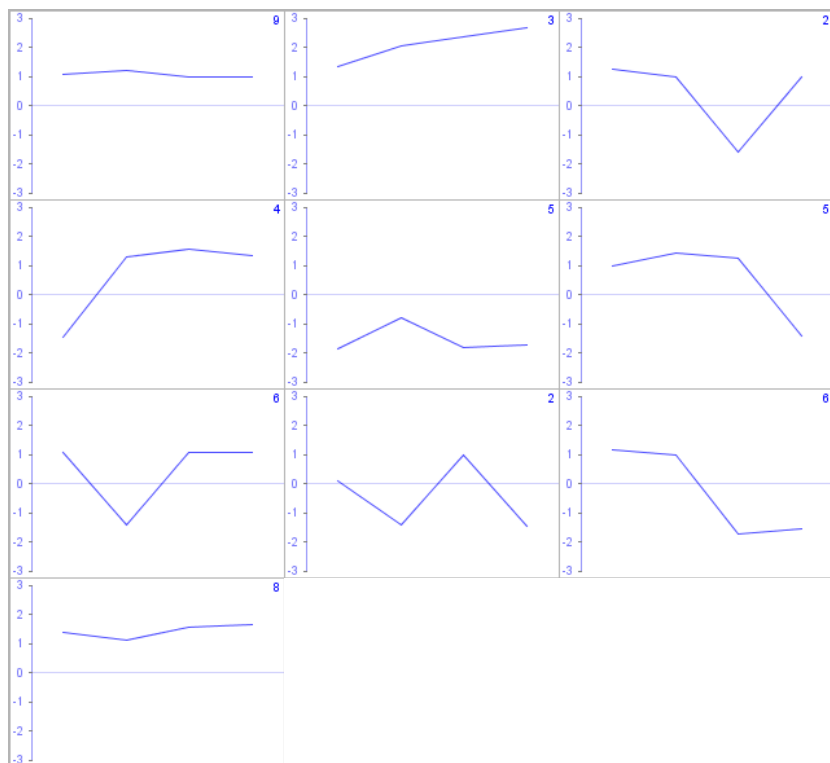
Příloha 3: Tabulka proteinů doplněných ze studie Černý et al. (2013)

No.	AGI	Name	Abbreviation (Uniprot)	EC	Localization (SUBA)		Function (TAIR, UniProt)
					MS/MS	GFP	
S01	At4g33010	Glycine dehydrogenase [decarboxylating] 1, mitochondrial	GLDP1	1.4.4.2	mitochondrion, plastid	N/A	degradation of glycine
S03	At3g48990	AMP-dependent synthetase and ligase family protein		6.2.1.-	plasma membrane, plastid	cytosol, peroxisome, plastid	defence response, response to Cd
S04	At1g79550	Phosphoglycerate kinase		2.7.2.3	plasma membrane	N/A	glycolysis
S05	At2g43750	Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplastic	OASB	2.5.1.47	plastid	plastid	Cys synthesis
S06	At2g38140	30S ribosomal protein S31, chloroplastic	RPS31	–	plastid, nucleus	nucleus	part of the 30S ribosomal subunit, chloroplast formation
S09	At2g16600	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP19-1	CYP19-1	5.2.1.8	plasma membrane, cytosol	cytosol	protein folding
S18	At1g22530	Patellin-2	PATL2	–	plasma membrane, plastid, nucleus	N/A	cell cycle, cell division, transport
S26	At3g16410	Nitrile-specifier protein 4	NSP4	–	extracellular, plasma membrane	N/A	glucosinolate catabolic process, nitrile biosynthetic process
S29	At2g13360	Serine--glyoxylate aminotransferase	AGT1	2.6.1.45	peroxisome, plastid	N/A	photorespiration
S31	At3g01480	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic	CYP38	5.2.1.8	plastid	N/A	protein folding, assembling of PSII
S35	At3g01480	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic	CYP38	5.2.1.8	plastid	N/A	protein folding, assembling of PSII

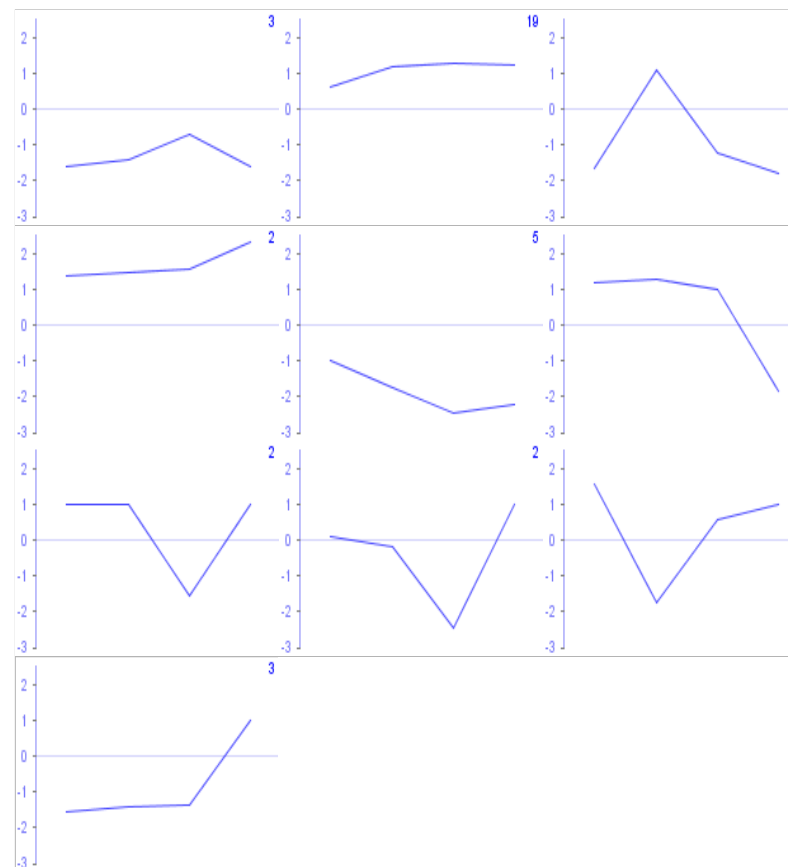


Příloha 4: Nejčastěji zastoupené expresní profily; čísla v pravém horním rohu ukazují počet proteinových spotů s daným profilem

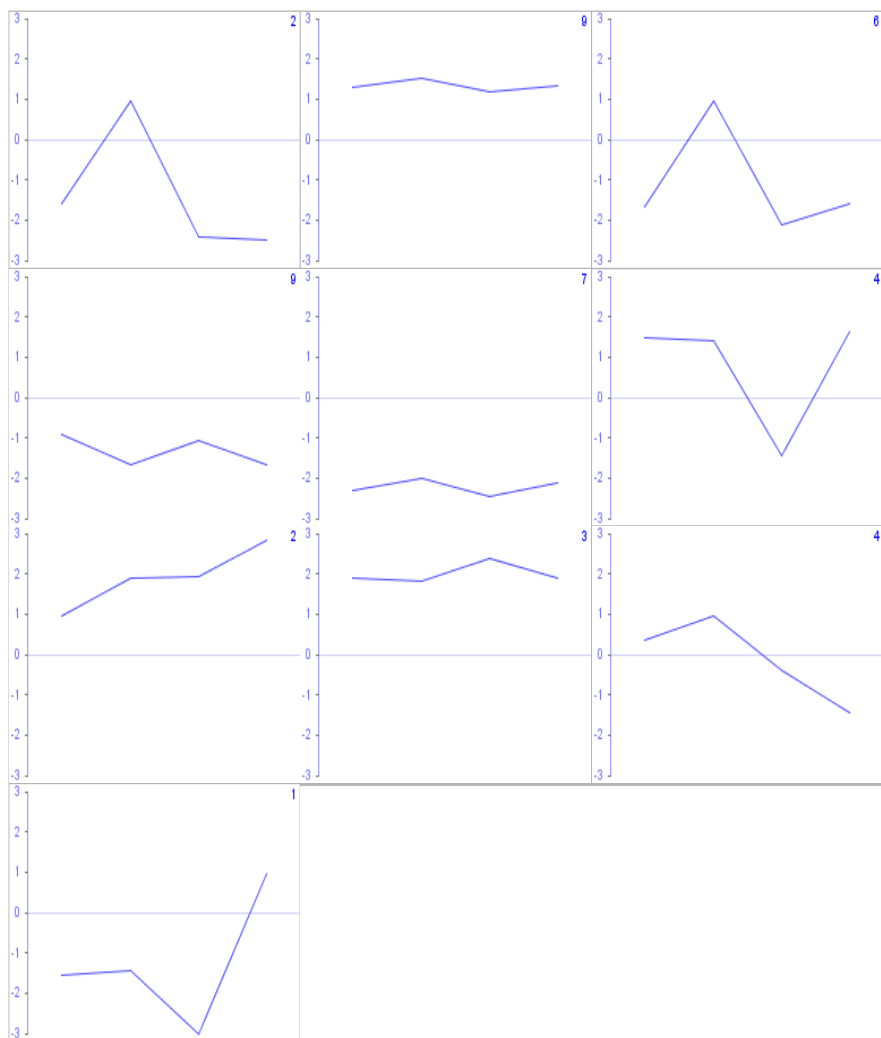
(a) Standardní intenzita světla, normální hladina cytokininů



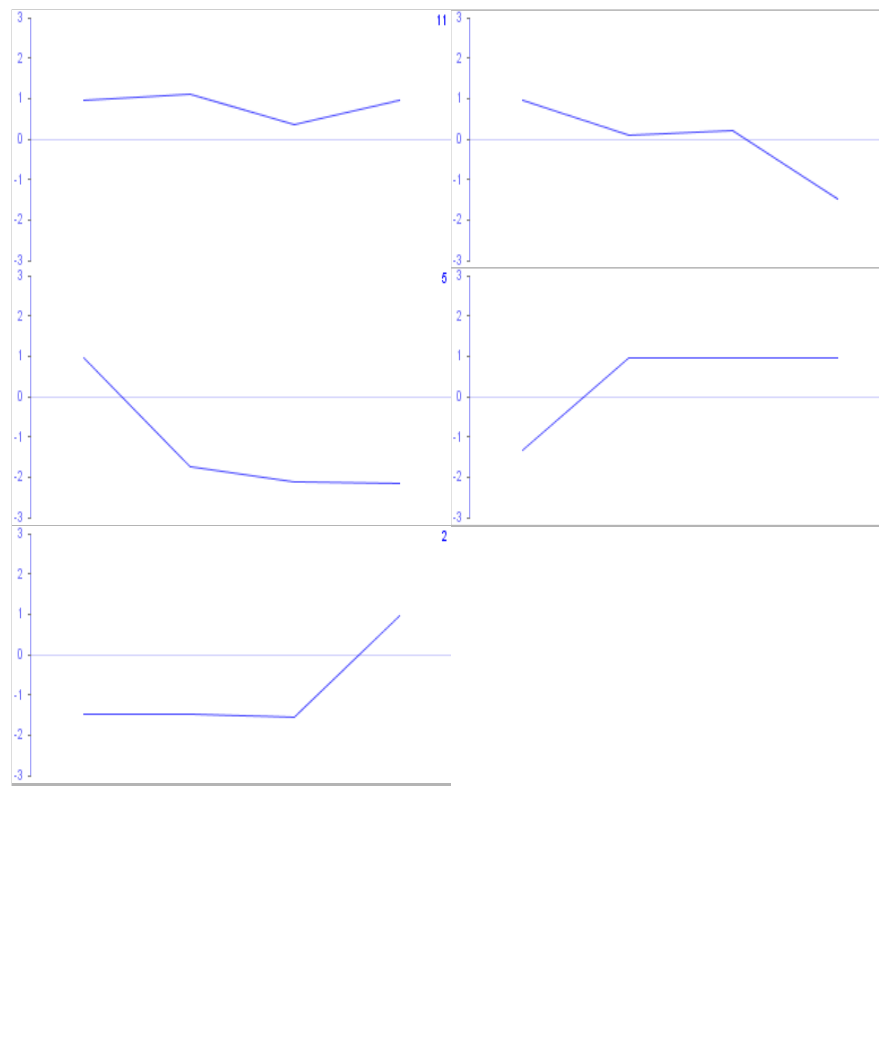
(b) Standardní intenzita světla, snížená hladina cytokininů



c) Nízká intenzita světla, normální hladina cytokininů



(d) Nízká intenzita světla, snížená hladina cytokininů



## Příloha 5: Výstup programu String

<a href="#">CRU2</a>	cruciferin 2; Seed storage protein (455 aa)
<a href="#">c-NAD-MDH1</a>	malate dehydrogenase (332 aa)
<a href="#">CRB</a>	RNA binding protein; Binds and cleaves RNA, particularly in stem-loops. Associates with pre-ribosomal particles in chloroplasts, and participates in chloroplast ribosomal RNA metabolism, probably during the final steps of 23S rRNA maturation. May enhance transcription by the plastid-encoded polymerase and translation in plastid via the stabilization of ribosome assembly intermediates. Required for chloroplast integrity. Involved in the regulation of the circadian system. Involved in the regulation of heteroglycans and monosaccharide mobilization (378 aa)
<a href="#">GAPA-2</a>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2; Involved in the photosynthetic reductive pentose phosphate pathway (Calvin-Benson cycle). Catalyzes the reduction of 1,3-diphosphoglycerate by NADPH (By similarity) (399 aa)
<a href="#">F3O9.27</a>	proteasome subunit PAB1; The proteasome is a multicatalytic proteinase complex which is characterized by its ability to cleave peptides with Arg, Phe, Tyr, Leu, and Glu adjacent to the leaving group at neutral or slightly basic pH. The proteasome has an ATP-dependent proteolytic activity (235 aa)
<a href="#">PATL2</a>	PATELLIN 2; Carrier protein that may be involved in membrane- trafficking events associated with cell plate formation during cytokinesis. Binds to some hydrophobic molecules such as phosphoinositides and promotes their transfer between the different cellular sites (By similarity) (683 aa)
<a href="#">GAPB</a>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B; Involved in the photosynthetic reductive pentose phosphate pathway (Calvin-Benson cycle). Catalyzes the reduction of 1,3-diphosphoglycerate by NADPH (By similarity) (447 aa)
<a href="#">PAE1</a>	20S proteasome alpha subunit E1; The proteasome is a multicatalytic proteinase complex which is characterized by its ability to cleave peptides with Arg, Phe, Tyr, Leu, and Glu adjacent to the leaving group at neutral or slightly basic pH. The proteasome has an ATP-dependent proteolytic activity (237 aa)
<a href="#">CPN60B</a>	chaperonin 60 beta; Binds RuBisCO small and large subunits and is implicated in the assembly of the enzyme oligomer. Involved in protein assisted folding. Required for proper plastid division (600 aa)
<a href="#">HPR</a>	hydroxypyruvate reductase; Catalyzes the NADH-dependent reduction of hydroxypyruvate into glycerate in the photorespiratory core cycle. Mediates fatty acid beta-oxidation in germinating seeds when malate dehydrogenase is absent (387 aa)
<a href="#">PDIL1-2</a>	PDI-like 1-2; Acts as a protein-folding catalyst that interacts with nascent polypeptides to catalyze the formation, isomerization, and reduction or oxidation of disulfide bonds (By similarity) (508 aa)
<a href="#">PGK</a>	phosphoglycerate kinase (401 aa)
<a href="#">ACO3</a>	aconitase 3; Catalyzes the isomerization of citrate to isocitrate via cis-aconitate (By similarity) (990 aa)
<a href="#">AGT</a>	alanine-glyoxylate aminotransferase; Photorespiratory enzyme that catalyzes transamination reactions with multiple substrates (401 aa)
<a href="#">NIR1</a>	nitrite reductase 1; Catalyzes the six-electron reduction of nitrite to ammonium (586 aa)
<a href="#">ROC3</a>	rotamase CYP 3; PPIases accelerate the folding of proteins. It catalyzes the cis-trans isomerization of proline imidic peptide bonds in oligopeptides (By similarity) (173 aa)
<a href="#">NADP-ME1</a>	NADP-malic enzyme 1 (581 aa)
<a href="#">FBA1</a>	fructose-bisphosphate aldolase 1 (399 aa)
<a href="#">AT2G25280</a>	uncharacterized protein (291 aa)
<a href="#">GLDP2</a>	glycine decarboxylase P-protein 2; The glycine decarboxylase (GDC) or glycine cleavage system catalyzes the degradation of glycine. The P protein binds the alpha-amino group of glycine through its pyridoxal phosphate cofactor; CO(2) is released and the remaining methylamine moiety is then transferred to the lipoamide cofactor of the H protein (By similarity) (1044 aa)
<a href="#">GSTF9</a>	glutathione S-transferase; In vitro, possesses glutathione S-transferase activity toward 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and benzyl isothiocyanate (BITC), and glutathione peroxidase activity toward cumene hydroperoxide and linoleic acid-13-hydroperoxide. May be involved in the conjugation of reduced glutathione to a wide number of exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles and have a detoxification role against certain herbicides (215 aa)

[AT2G31390](#) fructokinase; May play an important role in maintaining the flux of carbon towards starch formation (By similarity) (325 aa)

[PSRP4](#) 30S ribosomal protein S31 (118 aa)

[RCA](#) rubisco activase; Activation of RuBisCO (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; EC 4.1.1.39) involves the ATP-dependent carboxylation of the epsilon-amino group of lysine leading to a carbamate structure (474 aa)

[OASB](#) cysteine synthase (392 aa)

[HOL1](#) HARMLESS TO OZONE LAYER 1; S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase. Involved in glucosinolate metabolism and defense against phytopathogens. Highly reactive to thiocyanate (NCS(-)) derived from myrosinase-mediated hydrolysis of glucosinolates upon tissue damage (246 aa)

[ATCS](#) citrate synthase 4 (474 aa)

[CYP38](#) cyclophilin 38; PPIases accelerate the folding of proteins. It catalyzes the cis-trans isomerization of proline imidic peptide bonds in oligopeptides. Required for the assembly and stabilization of PSII (437 aa)

[CA1](#) carbonic anhydrase 1; Reversible hydration of carbon dioxide (347 aa)

[GAPC1](#) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic; Key enzyme in glycolysis that catalyzes the first step of the pathway by converting D-glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) into 3-phospho-D-glyceroyl phosphate. Essential for the maintenance of cellular ATP levels and carbohydrate metabolism. Involved in response to oxidative stress by mediating plant responses to abscisic acid (ABA) and water deficits through the activation of PLDDELTA and production of phosphatidic acid (PA), a multifunctional stress signaling lipid in plants. Required for full fertility. Binds DNA in vitro (338 aa)

[PYK10](#) beta-glucosidase 23; May possess beta-D-glucosidase and beta-D-fucosidase activity. Required for the beneficial interaction with the endophytic fungus *P.indica*. May participate in the control of root colonization by *P.indica* by repressing defense responses and modulating other responses required for a mutualistic interaction (524 aa)

[CDC48](#) cell division cycle 48; Probably functions in cell division and growth processes. Interacts with certain SNAREs as part of specialized membrane fusion events where vesicles from the same organelle fuse (homotypic fusion) (By similarity) (809 aa)

[Cpn60beta2](#) chaperonin-60beta2; Involved in protein assisted folding (596 aa)

[NAI2](#) DNA topoisomerase-like protein (772 aa)

[NSP4](#) Nitrile-specifier protein 4; Promotes simple nitriles, but not epithionitrile or thiocyanate formation. Converts allylglucosinolate and benzylglucosinolate to their corresponding simple nitriles in the presence of myrosinase (619 aa)

[mtLPD2](#) lipoamide dehydrogenase 2; Lipoamide dehydrogenase is a component of the glycine decarboxylase (GDC) or glycine cleavage system as well as of the alpha-ketoacid dehydrogenase complexes. LPD1 is probably the protein most often associated with the glycine decarboxylase complex while LPD2 is probably incorporated into alpha-ketoacid dehydrogenase complexes (507 aa)

[HSP60](#) chaperonin CPN60; Implicated in mitochondrial protein import and macromolecular assembly. May facilitate the correct folding of imported proteins. May also prevent misfolding and promote the refolding and proper assembly of unfolded polypeptides generated under stress conditions in the mitochondrial matrix (577 aa)

[PRXQ](#) peroxiredoxin Q; Reduces hydrogen peroxide with reducing equivalents provided through the thioredoxin system. Could be involved in the photosystem II protection against hydrogen peroxide (217 aa)

[GAPA](#) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A; Involved in the photosynthetic reductive pentose phosphate pathway (Calvin-Benson cycle). Catalyzes the reduction of 1,3-diphosphoglycerate by NADPH (By similarity) (396 aa)

[AAE3](#) ACYL-ACTIVATING ENZYME 3 (514 aa)

[LOS4](#) DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 38; ATP-dependent RNA helicase essential for mRNA export from the nucleus. Plays an important role in the positive regulation of CBF/DREB transcription factors (496 aa)

[ADSS](#) adenylosuccinate synthase; Plays an important role in the de novo pathway and in the salvage pathway of purine nucleotide biosynthesis. Catalyzes the first committed step in the biosynthesis of AMP from IMP (By similarity) (490 aa)

[AT3G60750](#) Transketolase; Catalyzes the reversible transfer of a two-carbon ketol group from fructose-6-phosphate or sedoheptulose-7-phosphate to glyceraldehyde-3-phosphate to yield xylulose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate or ribose-5-phosphate, respectively (By similarity). Could act as a stress sensor involved in adaptation process (741 aa)

<a href="#">PBF1</a>	proteasome subunit beta type-1; The proteasome is a multicatalytic proteinase complex which is characterized by its ability to cleave peptides with Arg, Phe, Tyr, Leu, and Glu adjacent to the leaving group at neutral or slightly basic pH. The proteasome has an ATP-dependent proteolytic activity (By similarity) (223 aa)
<a href="#">ROC4</a>	rotamase CYP 4; PPIases accelerate the folding of proteins. It catalyzes the cis-trans isomerization of proline imidic peptide bonds in oligopeptides (313 aa)
<a href="#">PSBQ-2</a>	photosystem II subunit Q-2; Required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophic growth under low light conditions (230 aa)
<a href="#">PSBQA</a>	photosystem II subunit QA; Required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophic growth under low light conditions (224 aa)
<a href="#">AT4G23680</a>	SRPBCC ligand-binding domain-containing protein (151 aa)
<a href="#">cpHsc70-1</a>	chloroplast heat shock protein 70-1; Acts redundantly with HSP70-7 in the thermotolerance of germinating seeds. Plays an important role in the protein precursor import into chloroplasts (718 aa)
<a href="#">FSD1</a>	Fe superoxide dismutase 1; Destroys superoxide anion radicals which are normally produced within the cells and which are toxic to biological systems (212 aa)
<a href="#">At4g26970</a>	aconitase 2; Catalyzes the isomerization of citrate to isocitrate via cis-aconitate (By similarity) (995 aa)
<a href="#">CRU3</a>	cruciferin 3; Seed storage protein (524 aa)
<a href="#">emb2726</a>	embryo defective 2726; Associates with the EF-Tu.GDP complex and induces the exchange of GDP to GTP. It remains bound to the aminoacyl-tRNA.EF- Tu.GTP complex up to the GTP hydrolysis stage on the ribosome (By similarity) (953 aa)
<a href="#">ASP5</a>	aspartate aminotransferase; Important for the metabolism of amino acids and Krebs- cycle related organic acids. In plants, it is involved in nitrogen metabolism and in aspects of carbon and energy metabolism (462 aa)
<a href="#">GLDP1</a>	glycine decarboxylase P-protein 1; The glycine decarboxylase (GDC) or glycine cleavage system catalyzes the degradation of glycine. The P protein binds the alpha-amino group of glycine through its pyridoxal phosphate cofactor; CO(2) is released and the remaining methylamine moiety is then transferred to the lipoamide cofactor of the H protein (By similarity) (1037 aa)
<a href="#">SHM1</a>	glycine hydroxymethyltransferase; Functions in the photorespiratory pathway in catalyzing the interconversion of serine and glycine. Involved in controlling cell damage caused by abiotic stress, such as high light and salt and the hypersensitive defense response of plants (517 aa)
<a href="#">HSC70-1</a>	heat shock 70kDa protein 1/8; Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. Mediator functions as a bridge to convey information from gene-specific regulatory proteins to the basal RNA polymerase II transcription machinery. The Mediator complex, having a compact conformation in its free form, is recruited to promoters by direct interactions with regulatory proteins and serves for the assembly of a functional preinitiation complex with RNA polymerase II and the general transcription factors (By s [...] (651 aa)
<a href="#">SIR</a>	sulfite reductase; Essential protein with sulfite reductase activity required in assimilatory sulfate reduction pathway during both primary and secondary metabolism and thus involved in development and growth (642 aa)
<a href="#">CA2</a>	carbonic anhydrase 2; Reversible hydration of carbon dioxide. This isoform ensures the supply of bicarbonate for pep carboxylase (331 aa)
<a href="#">AT5G17380</a>	2-hydroxyacyl-CoA lyase; Catalyzes a carbon-carbon cleavage reaction; cleaves a 2-hydroxy-3-methylacyl-CoA into formyl-CoA and a 2-methyl-branched fatty aldehyde (By similarity) (572 aa)
<a href="#">ATMS1</a>	methionine synthesis 1; Catalyzes the transfer of a methyl group from 5-methyltetrahydrofolate to homocysteine resulting in methionine formation (765 aa)
<a href="#">AT5G23540</a>	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14; Metalloprotease component of the 26S proteasome that specifically cleaves 'Lys-63'-linked polyubiquitin chains. The 26S proteasome is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins. The function of the 'Lys-63'-specific deubiquitination of the proteasome is unclear (By similarity) (308 aa)
<a href="#">ATPA</a>	ATP synthase subunit alpha; Produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane. The alpha chain is a regulatory subunit (By similarity) (507 aa)
<a href="#">PB</a>	ATP synthase subunit beta; Produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane. The catalytic sites are hosted primarily by the beta subunits (By similarity) (498 aa)

(*Arabidopsis thaliana*)